

Post-transplantasjons-diabetes mellitus i nyretransplanterte pasienter: En bihormonell sykdom

Erlend Johannessen Egeland



Masteroppgave ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015

Post-transplantasjons-diabetes mellitus i nyretransplanterte pasienter: En bihormonell sykdom

Erlend Johannessen Egeland

Masteroppgave ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Veiledere:

Anders Åsberg, professor dr. scient

Trond Jenssen, overlege professor dr. med

Anders Hartmann, overlege professor dr. med

Thea Anine Strøm Halden, MSc. pharm

Utført ved:

Nyrefysiologisk Laboratorium

Avdeling for Transplantasjonsmedisin

Rikshospitalet

Oslo

© Forfatter

2015

Post-transplantasjons-diabetes mellitus i nyretransplanterte pasienter: En bihormonell sykdom

Forfatter: Erlend Johannessen Egeland

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Jeg har hatt et fantastisk spennende og lærerikt år på Nyrefysiologisk laboratorium, OUS Rikshospitalet. Jeg vil takke alle som har bidratt og hjulpet meg med masteroppgaven, og en ekstra stor takk til:

MSc. Pharm Thea Anine Strøm Halden for å ha hjulpet til med alt gjennom året og for mange artige dager på klinisk forskningspost.

Professor dr. scient Anders Åsberg for all veiledning, fantastisk responstid på e-post og hjelp under skriveprosessen.

Professor dr. med Trond Jenssen for faglig veiledning og gode humør

Professor dr.med Anders Hartmann for minst like gode humør

Bioingeniørene Kirsten Lund, May Ellen Lauritsen og sykepleier Sebastian Müller for all fantastisk hjelp på forsøksdagene, samt trivelige samtaler på labben!

Professor dr. med Karsten Midtvedt for all hjelp med rekruttering av pasienter, og for å alltid stille opp ved forsøksdagene

Professor Jens Juul Holst, samt Lene Brus Albæk og Sofie Pilgaard Olesen for å analysere glukagon ved Biomedisinsk Institutt, Universitetet i København

Åse Lund for analysering av insulin ved ved Metabolsk og nyremedisinsk forskningslaboratorium, Universitetet i Tromsø

Alle pasientene som stilte opp og gjorde studien mulig å gjennomføre

Til slutt vil jeg takke Maria for all tålmodighet og for fantastisk støtte gjennom hele året

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon.....	1
1.1	Aktiv nyresviktbehandling.....	1
1.1.1	Nyretransplantasjon.....	1
1.1.2	Immunsuppressiv behandling.....	2
1.1.3	Diabetogene effekter av immunsuppressiva.....	3
1.1.4	Glukosemetabolisme før og etter nyretransplantasjon	4
1.2	Post-transplantasjons-diabetes mellitus (PTDM)	6
1.2.1	Definisjon og diagnose.....	6
1.2.2	Insidens	7
1.2.3	Patogenese.....	8
1.2.4	Risikofaktorer for PTDM	8
1.2.5	Behandling av PTDM	9
1.3	Glukosemetabolisme.....	11
1.3.1	Glukagon/insulin-aksen.....	13
1.4	Inkretinhormoner.....	14
1.4.1	Utskillelse.....	14
1.4.2	Effekter på glukosemetabolismen	15
1.4.3	Legemidler som påvirker inkretinsystemet	15
1.5	Momenter i forsøksoppsettet	17
1.5.1	Hyperglykemisk clamp	17
1.5.2	Arginintest.....	17
1.6	Studiens hensikt	18
2	Materialer og metoder	19
2.1	Studiedesign	19
2.2	Pasienter	19
2.3	Forsøksdagene.....	21
2.3.1	GLP-1/Placebo	22
2.3.2	Hyperglykemisk clamp	22
2.3.3	Test av restkapasitet i pankreas.....	23
2.4	Prøvetakning	23
2.4.1	Hematologiske parametere	23
2.4.2	Plasmaglukose.....	23
2.4.3	Glukagon.....	24
2.4.4	Insulin.....	24
2.4.5	Blodtrykk.....	24
2.5	Analyser	25
2.5.1	Glukose	25
2.5.2	Insulin.....	25
2.5.3	Glukagon.....	25
2.6	Beregninger	26
2.6.1	Glukosemediert glukagonsuppresjon	26

2.6.2	Glukosemediert insulinsekresjon	26
2.6.3	Fastende konsentrasjoner av glukagon og insulin.....	26
2.6.4	Insulinsekresjon.....	27
2.6.5	Effekt av GLP-1 på insulin og glukagonsekresjon ved fastende plasmaglukose	27
2.6.6	Hyperglykemisk effekt ved GLP-1 infusjon	27
2.6.7	Akutt insulin- og glukagonrespons	27
2.6.8	Insulinsensitivitet	27
2.6.9	Plasmaglukose under hyperglykemisk clamp	28
2.6.10	Nyrefunksjon	28
2.7	Statistikk.....	29
2.7.1	Antall pasienter	29
2.7.2	Statistiske metoder	29
2.7.3	Grafer	29
3	Resultater.....	30
3.1	Pasienter	30
3.2	Glukagon og insulin.....	32
3.3	Restkapasitet i pankreas	33
3.4	Insulinsensitivitet	35
3.5	Interaksjon mellom insulin- og glukagonsekresjon.....	35
4	Diskusjon	36
4.1	Glukagon og insulin.....	36
4.2	Styrker og svakheter	38
4.3	Veien videre i prosjektet	40
5	Konklusjon.....	41
	Litteraturliste	42
	Appendiks A: Studien.....	49
	Appendiks B: Poster Vintermøtet 2015	88

Summary in English

Introduction: Kidney transplant recipients (KTRs) have a higher risk of premature cardiovascular disease and death, than the general population. Development of post-transplantation-diabetes mellitus (PTDM) after renal transplantation is a serious complication and further increases this risk. Immunosuppressive medications and viral infections increases the risk of diabetes evolving after transplantation. PTDM is thought to be a variant of type 2 diabetes mellitus (T2DM), but T2DM is not characterized only by reduced insulin secretion and insulin sensitivity, but also increased glucagon secretion (hyperglucagonemia) which combined leads to elevated plasma glucose concentrations during fasting and after meals. The hyperglycemic clamp technique with a concomitant infusion of the incretin hormone, glucagon like peptide-1 (GLP-1), and an arginine potentiation test gives an adequate characterization of α - and β -cell function. There is no information regarding glucagon secretion in KTRs with PTDM. The purpose of this study is to investigate if hyperglucagonemia is an important underlying mechanism behind the hyperglycemia seen in KTRs with PTDM

Materials and methods: 12 KTRs with PTDM and 12 KTRs with normal glucose tolerance (control group) matched by age, sex, BMI and kidney function were included in an open, prospective, randomized and controlled study. The patients were studied on two different occasions, 2-4 weeks apart. Each study day involved an infusion of GLP-1/placebo (in randomized order) for 3 hours, start of a hyperglycemic clamp after 1 hour where plasma glucose levels were elevated 5 mmol/L above fasting levels, and a test of pancreatic maximum secretory capacity by injecting 5 grams of arginine i.v. at the end of the experiment. Blood samples were collected during the entire experiment for analysis of insulin- and glucagon concentrations.

Results: There were no significant differences in median fasting concentrations of either glucagon ($P = 0,87$) or insulin ($P = 0,50$) between the groups. The PTDM group had a significant worse glucose mediated glucagon suppression during the hyperglycemic clamp compared to the control group (reduction from baseline; 42 % vs. 68 %, $P < 0,001$), parallel with a significant lower first phase insulin secretion ($P < 0,001$), and a lower capacity to increase insulin secretion from baseline to the end of the clamp compared to the control group, median (IQR) (74 (56-108) % vs. 319 (198-717) %, $P < 0,001$). There were no differences in the pancreatic capacity to secrete glucagon, i.e. acute glucagon response

(AGR) between the groups. The patients in the PTDM group had a significant lower acute insulin response (AIR) than the control group ($P = 0,02$). The GLP-1 infusion contributed to a significant increase in first phase insulin secretion in both groups, but it was significantly lower in the PTDM group than the control group ($P = 0,001$). There were no differences in insulin sensitivity between the groups ($P = 0,24$)

Conclusion: This study has proved that PTDM is a bihormonal disease with a combination of reduced insulin secretion and glucagon suppression during hyperglycemia. Contrary to patients with T2DM, KTRs with PTDM do not exhibit elevated fasting glucagon concentrations, which might explain why KTRs with PTDM often exhibit isolated postprandial hyperglycemia. We have also described the insulinotropic effects of GLP-1 in KTRs with and without PTDM. The study also shows that PTDM is mainly caused by disturbed pancreatic secretion and not insulin sensitivity.

Sammendrag

Introduksjon: Nyretransplanterte pasienter har en signifikant høyere risiko for tidlig kardiovaskulær sykdom og død enn den generelle befolkningen. Utvikling av post-transplantasjons-diabetes mellitus er en alvorlig komplikasjon etter nyretransplantasjon som øker denne risikoen ytterligere. Blant annet den immunsuppressive behandlingen og virusinfeksjoner øker risikoen for at diabetes oppstår etter transplantasjon. Det antas at PTDM er en variant av type 2 diabetes mellitus (T2DM), men T2DM er ikke bare karakterisert av redusert insulinsekresjon og insulinsensitivitet, men også økt glukagonsekresjon (hyperglukagonemi) som sammen fører til forhøyede plasmaglukosekonsentrasjoner både ved faste og etter måltid. Hyperglykemisk clamp-undersøkelser med samtidig infusjon av inkretinhormonet glukagonliknende peptid-1 (GLP-1) samt stimulering med arginin, gir en adekvat karakterisering av funksjonen i α - og β -cellene. Per i dag finnes det ingen informasjon om glukagonsekresjon i pasienter med PTDM. Hensikten med denne studien var å undersøke om hyperglukagonemi er en viktig underliggende mekanisme for hyperglykemi i pasienter med PTDM.

Materialer og metode: 12 nyretransplanterte pasienter med PTDM og 12 nyretransplanterte med normal glukosetoleranse (kontrollgruppe) som matchet med hensyn på alder, kjønn, BMI og nyrefunksjon ble inkludert i en åpen, prospektiv, randomisert, kontrollert studie bestående av 2 forsøksdager med 2-4 ukers mellomrom. Hver forsøksdag bestod av infusjon av GLP-1/placebo (randomisert rekkefølge) over 3 timer, oppstart av hyperglykemisk clamp etter 1 time hvor plasmaglukosekonsentrasjonen ble økt med 5 mmol/L over fastende plasmaglukosekonsentrasjon, samt en test av restkapasiteten pankreas har til å skille ut henholdsvis insulin og glukagon ved å injisere 5 gram arginin i.v. mot slutten av forsøket. Blodprøver for analyse av insulin og glukagon ble tatt gjennom hele forsøket.

Resultater: Det var ingen signifikante forskjeller i median fastende konsentrasjon av verken glukagon ($P = 0,87$) eller insulin ($P = 0,50$) mellom gruppene. Pasientene i PTDM-gruppen hadde derimot en signifikant dårligere glukosemediert glukagonsuppresjon under hyperglykemisk clamp sammenliknet med kontrollgruppen (prosentvis reduksjon fra baseline; 42 % vs. 68 %, $P < 0,001$), parallelt med en signifikant lavere 1. fase insulinsekresjon ($P < 0,001$), samt redusert evne til å øke insulinsekresjonen fra baseline til slutten av clamp sammenliknet med kontrollgruppen, median (IQR), (74 (56-108) % mot 319 (198-717) %, $P < 0,001$). Det var ingen forskjell i restkapasiteten pankreas har til å skille ut

glukagon, i.e. akutt glukagonrespons (AGR), mellom gruppene. Pasientene i PTDM-gruppen hadde imidlertid en signifikant lavere akutt insulinrespons (AIR) enn kontrollgruppen ($P = 0,02$). Infusjon av GLP-1 førte til en signifikant økning i 1. fase insulinsekresjon i begge gruppene, men den var fortsatt signifikant lavere i PTDM-gruppen enn i kontrollgruppen ($P = 0,001$). Det var ingen forskjell i insulinsensitivitet mellom gruppene ($P = 0,24$).

Konklusjon: Med denne studien har vi bevist at PTDM er en bihormonell sykdom med både redusert insulinsekresjon og glukagonsuppresjon ved hyperglykemi. I motsetning til pasienter med T2DM, har nyretransplanterte pasienter med PTDM ikke forhøyede fastende glukagonkonsentrasjoner, noe som kan forklare hvorfor PTDM-pasienter ofte har isolert hyperglykemi postprandialt. I tillegg har vi beskrevet GLP-1 sin insulinotrope effekt ved hyperglykemi hos nyretransplanterte med og uten PTDM. Studien viser også at PTDM i hovedsak skyldes forstyrret sekresjon fra pankreas og ikke redusert insulinsensitivitet.

Forkortelser

ADA	«American Diabetes Association»
ADP	Adenosindifosfat
AGR	Akutt glukagonrespons
AIR	Akutt insulinrespons
ATP	Adenosintrifosfat
BMI	Kroppsmasseindeks
cAMP	Syklisk adenosinmonofosfat
CsA	Ciklosporin
DD	Død donor
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
ESRD	«End stage renal disease»
GABA	Gammaaminosmørsyre
GCP	«Good clinical practice»
GFR	Glomerulær filtrasjonsrate
GIP	Glukoseavhengig insulinotropt peptid
GK	Glukokortikoider
GLP-1	Glukagonliknende peptid-1
GLP-2	Glukagonliknende peptid-2
HbA1c	Glykosylert hemoglobin
IFG	«Impaired fasting glucose»
IGT	«Impaired glucose tolerance»
ISI	Insulinsensitivitetsindeks
IU	«International unit»
KTR	«Kidney transplant recipient»
LD	Levende donor
MDRD	«Modification of Diet in Renal Disease»
mTOR	«mammalian target of rapamycin»
OGTT	Oral glukosetoleransetest
NaCl	Natriumklorid
OUS	Oslo Universitetssykehus
PC 1/3	Prohormon konvertase 1/3

PC 2	Prohormon konvertase 2
PTDM	Post-transplantasjons-diabetes mellitus
REK	Regional etisk komité
T1DM	Type 1 diabetes mellitus
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
Tac	Takrolimus
WHO	Verdens helseorganisasjon

1 Introduksjon

Ved kronisk nyresvikt er risikoen for tidlig kardiovaskulær sykdom og død signifikant forhøyet. Risikoen øker proporsjonalt med grad av nyresvikt og er høyest hos pasienter med "End Stage Renal Disease" (ESRD) [1, 2]. Etter nyretransplantasjon reduseres denne risikoen, men den er fortsatt betydelig høyere enn hos den generelle befolkningen [3]. Siden 1980-tallet er det gjort store forbedringer i den medikamentelle behandlingen av nyretransplanterte pasienter. Blant annet er antallet akutte reaksjoner (avstøtninger) kraftig redusert, og korttidsresultatene er gode. Når det gjelder langtidsresultater etter nyretransplantasjon er det imidlertid fortsatt rom for store forbedringer, da hovedårsakene til død hos transplanterte pasienter er kardiovaskulær sykdom i tillegg til kreft og infeksjoner. Fokus på forebygging og behandling av kardiovaskulære komplikasjoner i den nyretransplanterte populasjonen er derfor høy [3].

10-15 % av nyretransplanterte pasienter i Norge utvikler diabetes etter transplantasjon [4, 5]. Blant annet den immunsuppressive behandlingen og virusinfeksjoner øker risikoen for at diabetes oppstår etter transplantasjon. Dette er en alvorlig komplikasjon som øker risikoen for tidlig kardiovaskulær sykdom og død ytterligere [6, 7].

1.1 Aktiv nyresviktbehandling

I forbindelse med kronisk nyresvikt prøver man, så langt det er mulig, med preventiv behandling for å utsette nyreerstattende behandling ("Renal replacement therapy", RRT) som dialyse eller transplantasjon. Hos de fleste må man etter hvert uansett starte i nyreerstattende behandling. I perioden 2009-2013 startet 2596 pasienter RRT, og prevalensen av pasienter i RRT økte i samme periode fra 4069 til 4567 [8-12]. I Norge er målsetningen å kunne tilby transplantasjon til alle som har nytte av det, da overlevelsen og livskvaliteten er signifikant bedre hos pasienter som blir transplantert sammenliknet med pasienter i dialyse [13].

1.1.1 Nyretransplantasjon

I Norge nyretransplanteres det hvert år mellom 250-300 pasienter ved Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet. Rikshospitalet er et av de største nyretransplantasjonssentrene i verden, og er størst i Europa. I Norge er det ingen øvre eller nedre aldersgrense for den som blir transplantert. Det viktigste kriteriet er at pasienten har

nytte av transplantasjonen, men flere faktorer kan føre til at transplantasjon ikke kan gjennomføres, som for eksempel; alvorlig hjertesykdom, nyoppstått kreft og aktive infeksjoner [14].

Resipienten (den som mottar organet) kan motta nyre fra en død donor (DD) eller en levende donor (LD). Ved LD-transplantasjon er det i hovedsak familiemedlemmer som donerer, men det er en trend at flere ubeslektede også donerer [15]. I Norge tilstreber man LD-transplantasjon, da dette har flere fordeler for resipient. Det er vist at langtidsoverlevelsen av både nyretransplantat og resipient er signifikant bedre sammenliknet med DD-transplantasjon [16]. Ved bruk av nyre fra LD er det lettere å planlegge transplantasjonen, noe som gjør det enklere å transplantere pasienter før det er nødvendig å starte i dialyse, såkalt pre-emptiv transplantasjon. Dette har vist å gi en bedre graftoverlevelse [17]. Dermed blir også flere nyrer fra DD tilgjengelig for andelen av pasienter som ikke finner en egnet LD-match [18]. Norges satsning på LD-transplantasjoner har ført til at Norge har en av verdens korteste ventelister for nyretransplantasjon.

1.1.2 Immunsuppressiv behandling

Etter nyretransplantasjon må alle pasienter settes på livslang immunsuppressiv behandling for å forhindre rejeksjon av graftet [19]. Det er forskjellige protokoller for hvilken immunsuppressiv behandling pasientene blir satt på, med utgangspunkt i hvilken risiko pasienten har for å avstøte nyren; standard-, intermediær- eller høy risiko. Standard immunsuppressiv behandling i Norge er et kvadrupelregime bestående av induksjonsterapi med basiliximab (Simulect[®]), etterfulgt av vedlikeholdsterapi med en kalsineurinhemmer (CNI, som takrolimus eller ciklosporin), et antiproliferativt medikament (mykofenolsyre (Myfortic[®]) eller mykofenolatmofetil (CellCept[®])) og prednisolon [14].

For kalsineurinhemming benyttes i hovedsak takrolimus (Prograf[®] eller Advagraf[®]), men pasienter med nedsatt glukosetoleranse før transplantasjon ("Impaired Glucose Tolerance", IGT) settes på ciklosporin (SandImmun[®] eller Sandimmun Neoral[®]) [14]. Begge medikamentene har et smalt terapeutisk vindu og stor interindividuell variabilitet. Det er derfor viktig å monitorere blodkonsentrasjonene av disse medikamentene for å kunne justere dosen ("Therapeutic Drug Monitoring", TDM). Dette for å unngå overdosering som kan føre

til bivirkninger og toksisitet eller underdosering som kan føre til reaksjoner og i ytterste konsekvens tap av graftet [20, 21].

De høye dosene av immunsuppressive medikamenter, inkludert prednisolon, trappes gradvis ned etter transplantasjon til stabile vedlikeholdsdoser. Dosen av prednisolon trappes ned i løpet av de første 6 månedene til en vedlikeholdsdose på 5 mg/døgn

I senere tid har medikamenter som hemmer mammalsk "Target of Rapamycin" (mTOR) som sirolimus (Rapamune®) og everolimus (Certican®) kommet som alternativer for CNI dersom disse er dårlig tolerert [22].

Behandling med immunsuppressive medikamenter medfører flere bivirkninger som økt infeksjons- og malignitetsrisiko, nyreskade, ufrivillig hårvekst (ciklosporin) og -hårtap (takrolimus), kvalme, diaré, anoreksi, neurotoksisitet som fører til tremor, sår og forsinket sårtilheling (sirolimus) samt osteoporose (prednisolon) [23, 24]. Bruk av CNI medfører i tillegg en doseavhengig og delvis reversibel inhibisjon av pankreatiske β -celler som fører til redusert insulinsekresjon, mens prednisolon i høye doser induserer insulinresistens ved å stimulere hepatisk glukoneogenese og svekke perifert glukoseopptak [25, 26].

1.1.3 Diabetogene effekter av immunsuppressiva

Det har siden 1960-tallet vært kjent at prednisolon er en viktig årsak til post-transplantasjonsdiabetes mellitus (PTDM) [27]. Glukokortikoider (GK) i høye doser induserer PTDM i hovedsak via økt insulinresistens, men det er også demonstrert en hemming av β -cellefunksjon [28]. GK øker hepatisk glukoneogenese, proteolyse, sentral og visceral adipositet, og dyslipidemi, mens glukoseopptak i muskel samt glykogensyntese reduseres [26]. Det er anbefalt å redusere prednisolondosen til 5 mg/døgn, da det er vist at glukosemetabolismen ikke forbedres ytterligere med lavere dose enn dette [29]. En meta-analyse av GK-seponering 3-6 måneder etter transplantasjon viste ingen forbedret effekt på PTDM-insidens [30]. Seponering kun dager etter transplantasjon har vist signifikant reduksjon i PTDM i kombinasjon med ciklosporin, men seponering vil også gi en økt potensiell risiko for akutt reaksjon og kronisk allograft patologi [31, 32].

Bruk av CNI medfører at GK-dosen kan reduseres, men CNI-behandling er diabetogen i seg selv. Kalsineurin er viktig for både vekst og funksjon av pankreatiske β -celler, og bruk av

CNI fører til utviklingen av PTDM via en doserelatert og delvis reversibel øy-celletoksisitet med hemming av insulin-genet og insulinsekresjon [25]. Det er forskjell i grad av diabetogen effekt mellom takrolimus og ciklosporin. DIRECT-studien fant at transplanterte pasienter behandlet med takrolimus hadde en samlet insidens av ”Impaired Fasting Glucose” (IFG) og PTDM på 33,6 % 6 måneder etter transplantasjon, mens pasienter behandlet med ciklosporin hadde en tilsvarende insidens på 26 % [33]. I Norge er det takrolimus som er førstevalg av CNI etter nyretransplantasjon, med unntak av pasienter med nedsatt glukosetoleranse før transplantasjon. Symphony-studien viste at lav-dosert takrolimus ga signifikant lavere biopsi-konfirmert akutt reaksjon (BPAR) enn ved standard-dosert takrolimus, lav-dosert ciklosporin eller sirolimus [34].

De antiproliferative medikamentene mykofenolat mofetil, mykofenolsyre og azatioprin ser ikke ut til å påvirke utviklingen av PTDM [35]. mTOR-hemmeren sirolimus derimot, er vist å ha en diabetogen effekt som er sammenliknbar med takrolimus [34, 36]. Foreslåtte mekanismer er redusert insulinmediert hemming av glykogenolyse, hypertriglyserid-indusert insulinresistens og øy-celletoksisitet [36].

Aasebo *et al.* viste at induksjonsbehandling med basiliximab ga signifikant økt risiko for utvikling av både IGT og PTDM 10 uker etter transplantasjon [37]. Induksjonsterapi med alemtuzumab (Lemtrada[®]) er i én studie assosiert med redusert risiko for å utvikle PTDM [38]. Dette medikamentet brukes ikke i Norge, men det utføres studier der alemtuzumab sammenliknes med basiliximab induksjonsbehandling [39].

1.1.4 Glukosemetabolisme før og etter nyretransplantasjon

I forbindelse med utvikling av ESRD, skjer det en endring av glukosemetabolismen i form av økt perifer insulinresistens, hyperinsulinemi og hyperglukagonemi [40, 41]. Pasienter som utvikler ESRD har økt sannsynlighet for å utvikle prediabetes. Prediabetes er ikke en klinisk diagnose, men en signifikant risikofaktor for å utvikle diabetes [42]. I litteraturen oppgis prediabetes som en samlebetegnelse for ”Impaired Fasting Glucose” (IFG) og ”Impaired Glucose Tolerance” (IGT) som kjennetegnes av henholdsvis forhøyede plasmaglukosekonsentrasjoner ved faste og etter måltid. Plasmaglukosekriteriene for IFG og IGT er oppgitt i Tabell 1.1. De patofysiologiske mekanismene bak den forstyrrede

glukosemetabolismen er ikke klarlagt, men Idorn *et al.* har vist at pasienter med ESRD og IGT har redusert inkretineffekt sammenliknet med nyrefriske (les mer om inkretineffekt i kapittel 1.4) [43].

De første ukene etter nyretransplantasjon står pasientene på høye doser av immunsuppressive medikamenter. Siden de diabetogene effektene av immunsuppressiva er doseavhengige og delvis reversible, utvikler hele 90 % av resipientene forbigående hyperglykemi (forhøyede plasmaglukosekonsentrasjoner) de første ukene etter transplantasjon [44, 45]. Selv om de fleste pasientene oppnår normoglykemi i forbindelse med nedtrapping av immunsuppressiva til stabile vedlikeholdsdoser, er det viktig å monitorere plasmaglukoseverdier de første to månedene etter transplantasjon for å identifisere pasienter med risiko for å utvikle PTDM så tidlig som mulig.

1.2 Post-transplantasjons-diabetes mellitus (PTDM)

1.2.1 Definisjon og diagnose

På et internasjonalt konsensussmøte om PTDM avholdt i september 2013, ble det enighet om å endre den tidligere terminologien "New-Onset Diabetes After Transplantation" (NODAT) til det nåværende "Post-Transplantation Diabetes Mellitus" (PTDM). Årsaken til endringen var at den gamle terminologien, NODAT, kunne være misledende, da pasienter med diabetes diagnostisert etter transplantasjon kan ha utviklet udiagnostisert diabetes i perioden før transplantasjon. Terminologien post-transplantasjons-diabetes mellitus favner om disse pasientene, da den kun beskriver nyretransplanterte med *nyoppdaget* diabetes [46].

Ved det forrige konsensussmøtet i 2003 ble det enighet om at de diagnostiske kriteriene for PTDM skulle være de samme som American Diabetes Association (ADA) og Verdens Helseorganisasjons (WHO) sine samstemte kriterier for diabetes, IFG og IGT [47]. ADAs sitt diagnostiske kriterium for IFG blitt strengere siden den gang. På konsensussmøtet i 2013 ble det dermed bestemt at ADAs nye kriterium for IFG også skulle benyttes i den nyretransplanterte populasjonen [42, 46]. Se Tabell 1.1.

Tabell 1.1: ADA og WHO sine kriterier for diabetes, IGT og IFG [42, 48].

Diabetes	
Fastende plasmaglukose	$\geq 7,0$ mmol/L
og/eller	
2-timers plasmaglukose*	$\geq 11,1$ mmol/L
og/eller	
HbA1c	$> 6,5$ %
"Impaired glucose tolerance" (IGT)	
2-timers plasmaglukose*	$\geq 7,8$ og $\leq 11,0$ mmol/L
"Impaired fasting glucose" (IFG)	
Fastende plasmaglukose	$\geq 5,6$ (6,1♦) og $\leq 6,9$ mmol/L

*Venøs plasmaglukose 2 timer etter oralt inntak av 75 gram glukose (standard glukosetoleransetest), bekreftet ved gjentatt testing på en annen dag

*Dersom 2-timers plasmaglukose ikke måles, kan ikke diabetes eller IGT ekskluderes

♦WHO sitt kriterium for IFG

Oral glukosetoleransetest

Gullstandarden for å diagnostisere diabetes er å utføre en oral glukosetoleranse-test (OGTT). Pasienten må møte til testen fastende, definert av WHO som ingen kaloriinntak siste 8 timer. Først måles fastende plasmaglukosekonsentrasjon (FPG). Deretter drikkes 75 g glukose anhydrat løst i vann, før det tas en ny plasmaglukosemåling etter 2 timer. Ut i fra disse plasmaglukosekonsentrasjonene vurderes det om pasienten har normal glukosetoleranse, prediabetes eller diabetes (Tabell 1.1). Utførelse av en OGTT er dessuten den eneste måten å diagnostisere IGT på, som er en risikofaktor for utvikling av PTDM [49].

Måling av FPG og glykosylert hemoglobin (HbA1c) er metoder som benyttes for å diagnostisere type 2 diabetes mellitus (T2DM) i den generelle befolkningen [42]. Dette er en enklere og mer effektiv diagnosemetode enn OGTT. Pasienter med PTDM har høye postprandiale plasmaglukosekonsentrasjoner, men i motsetning til pasienter med T2DM er det en tendens til normale FPG-konsentrasjoner. Måling av FPG alene vil derfor medføre underdiagnostisering av diabetes [49, 50]. I en studie utført av Armstrong *et al.* hvor 200 nyretransplanterte ble screenet for diabetes, ble kun 35 % av PTDM-pasientene oppdaget ved FPG alene [51].

HbA1c er ikke offisielt inkludert som et diagnostisk kriterium for pasienter som gjennomgår organtransplantasjon med eller uten nyresvikt [46]. Årsaken til dette er at HbA1c ikke kan detektere diabetes etter større kirurgiske inngrep før ny hemoglobin er syntetisert og glykosylert [52]. Selv om anemi vanligvis løses i løpet av få uker etter transplantasjon, kan den anemiske perioden påvirker HbA1c målt flere uker etter [46, 47]. HbA1c er derfor ikke en pålitelig test i den tidlige fasen etter transplantasjon. Eide *et al.* fant at bruk av HbA1c $\geq 6,5$ % som eneste diagnostiske kriterium for PTDM, kun fanget opp 38 % av pasientene som var diagnostisert med PTDM ved standard glukosekriterier under OGTT (Tabell 1.1). Sensitiviteten økte til 77,7 % da de kombinerte med FPG $\geq 7,0$ mmol/L [5]. Dette vil med andre ord si at rundt en fjerdedel av pasientene med PTDM blir diagnostisert med OGTT alene.

1.2.2 Insidens

I litteraturen varierer insidensen av PTDM mellom 2-50 % [53]. Årsaken til den store variasjonen er at det er benyttet forskjellige diagnostiske kriterier på de ulike transplantasjonssentrene [26]. Enkelte har stilt diagnosen PTDM dersom pasienten startet

behandling med antidiabetiske medikamenter > 30 dager etter transplantasjon [54], mens andre har brukt informasjon om refusjon av diabetesbehandling fra "Medicare" til å stille diagnosen [35]. Insidensen er økende på verdensbasis [54], og ble i USA rapportert til å være 20 % 2-3 måneder etter transplantasjon og dobbelt så høy etter 3 år [55]. I Norge er PTDM mindre prevalent, og det er til og med observert en liten nedgang i insidensen 2-3 måneder etter transplantasjon fra 18 % til 13 % det siste tiåret [4, 56].

1.2.3 Patogenese

PTDM har flere likhetstrekk med T2DM, som økt insulinresistens og redusert insulinsekresjon, men risikofaktorer som immunsuppresjon og opportunistiske infeksjoner gjør at PTDM regnes som en separat type diabetes.

Insulinresistens i lever-, muskel- og fettvev fører til redusert opptak av glukose, og også økt endogen glukoseproduksjon i lever, som igjen fører til hyperglykemi. Postprandialt frigir β -cellene i pankreas mindre insulin som gjør at insulinresistente celler får lavere eksponering av insulin. Det er en glidende overgang fra IGT til PTDM, og det er motstridende resultater om hvorvidt det er insulinresistensen som kommer først og dermed gir redusert insulinsekresjon, eller om det er redusert insulinsekresjon som er utslagsgivende [57, 58].

Det har lenge vært kjent at T2DM forårsakes av en forskyvning i insulin/glukagonaksen og at glukagon er spesielt viktig i patogenesen bak hyperglykemien både ved faste og etter måltid [59-62]. Historisk har forskning på dysfunksjonen i α -cellene og glukagon blitt overskygget av forskning på β -celler og insulin. Det er først i senere tid at oppmerksomheten har blitt rettet tilbake på α -cellene [63, 64].

Det vites ikke om pasienter med PTDM har en forskyvning i insulin/glukagon-aksen, da ingen har undersøkt glukagonkonsentrasjoner i PTDM-pasienter, verken ved faste eller ved hyperglykemi.

1.2.4 Risikofaktorer for PTDM

Risikofaktorer for å utvikle PTDM kan deles inn i modifiserbare, potensielt modifiserbare og umodifiserbare risikofaktorer. Blant disse er det risikofaktorer som ikke er transplantasjonsspesifikke og dermed flere av de samme som ved T2DM i den generelle

befolkningen. Økt bevissthet på umodifiserbare risikofaktorer kan hjelpe med å identifisere pasienter med høy risiko for å utvikle PTDM. Modifiserbare og potensielt modifiserbare risikofaktorer kan benyttes i forebyggingen og behandlingen av PTDM.

Transplantasjonsspesifikke risikofaktorer

Den viktigste transplantasjonsspesifikke og modifiserbare risikofaktoren for PTDM er det immunsuppressive legemiddelregimet. Montori *et al.* har estimert at immunsuppresjon er ansvarlig for 74 % av risikoen for å utvikle PTDM [65]. Tilstedeværelsen av human leukocyt antigen (HLA) som HLA A30, B27 og B42, økende HLA-mismatcher mellom donor og resipient, nyre fra avdød donor, mannlig donor, akutte reaksjonsepisoder og cytomegalovirus (CMV) infeksjon gir høyere risiko for å utvikle PTDM [66, 67]. Polycystisk nyresykdom er assosiert med PTDM i noen studier, men ikke alle [68].

Ikke-transplantasjonsspesifikke risikofaktorer

Overvekt, høy alder, IGT, familiehistorie med diabetes, mannlig kjønn, etnisitet (afrikansk amerikanere, latinamerikanere og indo-asiater) og hepatitt C-infeksjoner er alle risikofaktorer for både T2DM og PTDM [38, 42, 67]. Høy alder har lenge vært kjent som en viktig risikofaktor for utviklingen av PTDM. Cosio *et al.* viste at pasienter over 45 år har en 2,2 ganger høyere relativ risiko for å utvikle PTDM enn yngre pasienter [54].

1.2.5 Behandling av PTDM

Behandlingsstigen for stabil PTDM er først å forsøke med livsstilsendringer, for deretter å gå over til behandling med orale antidiabetikum. Hvis dette ikke gir tilfredsstillende blodsukkerregulerende effekt, settes pasienten på insulinbehandling.

En sunn livsstil med sunn mat og regelmessig fysisk aktivitet er viktig. Sharif *et al.* viste at livsstilsendringer med veiledning om trening, kosthold og vektnedgang ga en signifikant reduksjon i 2-timers plasmaglukosekonsentrasjon sammenliknet med utlevering av et informasjonshefte uten videre oppfølging [69].

Når behandling med oral antidiabetisk behandling igangsettes, er det viktig å unngå episoder med hypoglykemi. Alvorlig hypoglykemi, definert som plasmaglukosekonsentrasjon < 2,8 mmol/L og behov for hjelp fra en annen person, er assosiert med signifikant forhøyet risiko

for mikro-/makrovaskulære hendelser og død [70]. Bruk av antidiabetiske medikamenter medfører en fare for hypoglykemi, men det er ikke alle medikamenter som har like stor risiko. Dipeptidylpeptidase-4 (DPP4)-hemmere er fordelaktige da den blodsukkersenkende effekten er glukoseavhengig, og dermed kun inntreffer i forbindelse med måltid når blodsukkeret er høyt [71].

Metformin som er førstevalget ved T2DM brukes i liten grad hos pasienter med PTDM. Metformin skilles ut renalt, og redusert nyrefunksjon vil kunne føre til laktoacidose som er en potensielt dødelig tilstand [72].

Nyretransplanterte pasienter har lavere og større svingninger i glomerulær filtrasjonsrate (GFR) enn den generelle befolkningen. Bruk av antidiabetiske medikamenter som metaboliseres og skilles ut uavhengig av nyrene forenkler derfor behandlingen. Linagliptin (Trajenta[®]) trenger ingen dosejustering ved redusert nyrefunksjon [73], men ved GFR < 30 mL/min må doseringen av henholdsvis saksagliptin (Onglyza[®]), sitagliptin (Januvia[®]) og vildagliptin (Galvus[®]) reduseres [74]. Sikkerhet og effekt av sitagliptin er dokumentert hos pasienter med PTDM [75].

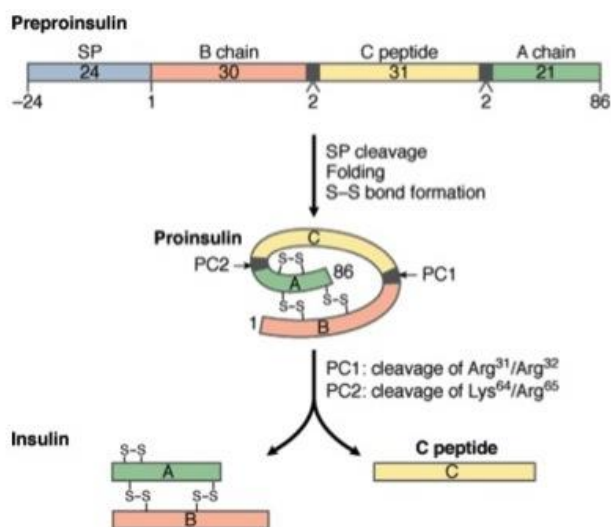
Sulfonylureaderivater og glinider er vist å kunne øke kardiovaskulære risiko [76]. Sulfonylureaderivater gir vektoppgang og ser i tillegg ut til å ha en negativ effekt på β -cellefunksjon [77].

1.3 Glukosemetabolisme

Tilførselen av næringsstoffer fra tarmen til blodet er ujevnt gjennom døgnet, men kroppen er til enhver tid avhengig av glukose. Lav glukosekonsentrasjon i blodet (hypoglykemi) er potensielt en akutt dødelig tilstand, og pasienter som har gjennomgått en akutt hypoglykemisk episode har, som tidligere nevnt, i etterkant økt risiko for kardiovaskulære hendelser (e.g. hjerteinfarkt og slag) og død [70]. Samtidig er forhøyede plasmaglukosekonsentrasjoner over tid skadelig for mikro- og makrovaskulære blodkar. Det er en hormonell homeostase som balanserer glukosekonsentrasjonen i blodet slik at den verken blir for høy eller for lav. Denne hormonelle homeostasen opprettholdes i hovedsak av insulin og glukagon, som har diametrisk motsatt effekt av hverandre; insulin utøver sin effekt ved måltid og reduserer glukosekonsentrasjonen, mens glukagon utøver sin effekt ved faste og øker glukosekonsentrasjonen i blodet [78].

Insulin

Insulin er et peptidhormon som utskilles fra β -cellene lokalisert i de Langerhanske øyer i pankreas. Insulinsyntesen starter i ru endoplasmatisk retikulum hvor preproinsulin (et peptid bestående av 110 aminosyrer) gjennomgår en umiddelbar omdannelse til proinsulin ved at signalmolekylet i enden av B-kjeden kløyves. Proinsulin blir transportert til golgiapparatet i vesikler der det blir ompakket i sekretoriske vesikler som inneholder prohormon konvertase 1 og 2 (PC1 og PC2) [79]. I disse sekretoriske vesiklene kløyves proinsulin til insulin og C-peptid i 1:1 ratio [80]. Se Figur 1.1.



Figur 1.1: Syntese og prosessering av preproinsulin til insulin og C-peptid [80].

Det er til enhver tid en basal sekresjon av insulin, men sekresjonen øker dramatisk ved måltid via stimulering av glukose, aminosyrer (e.g arginin), fettsyrer og ketoner. Sekresjonen av insulin reguleres primært av glukose og er nøye korrelert til glukosekonsentrasjonen i plasma; når glukosekonsentrasjonene øker, tas glukose opp i β -cellene via facilitert transport gjennom ”glucose transporter number 2” (GLUT2). Glukokinase fosforilerer glukosemolekylene som deretter gjennomgår glykolyse. Dette gir en økt ATP/ADP-ratio som stenger ATP-sensitiv K^+ -kanal på cellemembranen. Denne stengningen gir en hurtig depolarisering av cellen og en påfølgende åpning av L-type Ca^{2+} -kanal som medfører en Ca^{2+} -flux inn i β -cellen og sekresjon av insulin fra de sekretoriske vesiklene ut av cellen. Insulin skilles ut i pulser med omtrent 5 minutters mellomrom [81].

Ved økning i plasmaglukosekonsentrasjonen skilles insulin ut i to faser. Første fase er umiddelbar og fører til en maksimal konsentrasjon etter 2-3 minutter. Denne fasen regner man med er mediert av allerede klargjort insulin i sekretoriske vesikler. Andre fase har en mer langsom økning med maksimal insulinkonsentrasjon etter omtrent 1 time [82].

Insulin medierer opptak av glukose fra blodbanen og inn i cellene via binding til en tyrosinkinasereseptor på cellemembranen som gir rekruttering av transportproteinet ”glucose transporter number 4” (GLUT4). Effekten ses i de fleste vev, men effekten i leveren er spesielt viktig. Insulinmediert glukoseopptak i leveren gir en anabol effekt med økt glykogensyntese. Insulin har en halveringstid på 5-6 minutter i plasma på grunn av omfattende hepatisk clearance, mens C-peptid har en halveringstid på rundt 30 minutter. Siden insulin og C-peptid skilles ut fra β -cellene i ekvimolare mengder, er C-peptid en nyttig surrogatmarkør på hvor mye insulin som har blitt utskilt [83].

Glukagon

Glukagon er et peptidhormon som i hovedsak utskilles fra α -cellene lokalisert i de Langerhanske øyer i pankreas og utskillelsen blir trigget når plasmaglukosekonsentrasjonen faller under et visst nivå [84]. Glukagonsekresjonen øker også ved økte plasmakonsentrasjoner av aminosyrer og fettsyrer samt ved adrenerg stimulering [85]. Ved adrenerg stimuli fra adrenalin og det perifere nervesystemet øker konsentrasjonen av cAMP og Ca^{2+} i α -cellen og glukagon utskilles [85].

Glukagongenet (GCG) uttrykker proglukagon i pankreatiske α -celler, hjernen og i L-cellene i tarmen [85]. Proglukagon er et stort polypeptid bestående av 160 aminosyrer og er utgangspeptidet for flere biologisk aktive peptider som glicentin (proglukagon 1-69), glukagonliknende peptid 1 og 2 (GLP-1 og GLP-2). I de pankreatiske α -cellene blir proglukagon enzymatisk spaltet til glukagon av prohormon konvertase 2 (PC2) [86].

Glukagon virker på glukagonreseptoren (GCGR) som er en G-proteinkoblet reseptor som er uttrykt i lever og pankreatiske β -celler, men også i nyre, glatt intestinal muskel, hjerne, fettvev og placenta [87]. Binding av glukagon til GCGR i lever fører til aktivisering av adenylyl cyclase som gir cAMP-produksjon. cAMP aktiverer signalveier som gir økt glukoneogenese og glykogenolyse som sammen fører til økt hepatisk glukoseoutput som gir økt plasmaglukosekonsentrasjon [85].

1.3.1 Glukagon/insulin-aksen

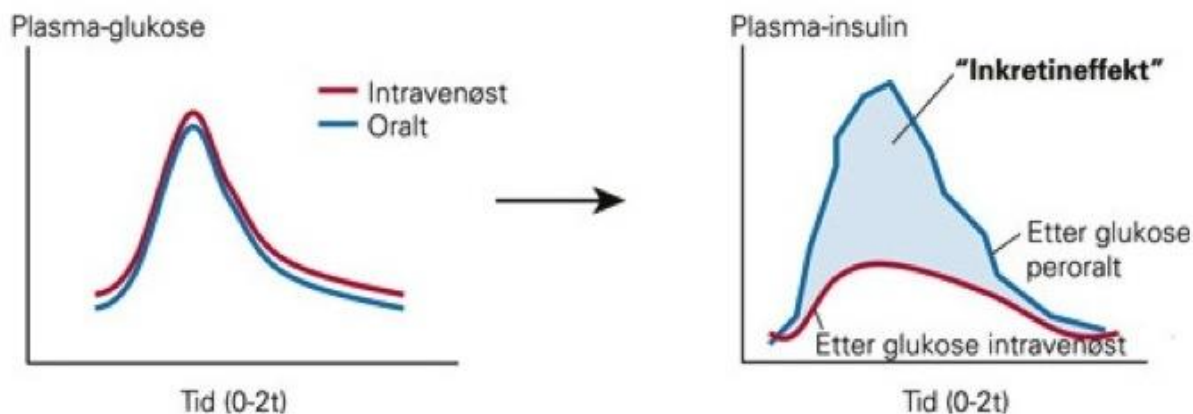
I de Langerhanske øyer i pankreas ligger α - og β -cellene side om side, og det er en nøye parakrin regulering av aktiviteten mellom glukagon og insulin; β -cellene sekreterer dessuten sink og gamma-aminosmørsyre (GABA) som virker hemmende på α -cellenes glukagonsekresjon. Det er uklart om hypoglykemi *per se* fører til sekresjon av glukagon, men den glukagonsupprimerende effekten av insulin og somatostatin er godt dokumentert [85].

Ved diabetessykdommer skjer det en forskyvning i insulin/glukagon-aksen. Type 1 diabetes mellitus (T1DM) er en sykdom som utvikles som følge av autoimmun destruksjon av β -cellene i pankreas som gjør at β -cellene og insulinproduksjonen forsvinner [80]. T2DM skyldes nedsatt insulinsensitivitet og en relativ reduksjon i kapasitet til å sekretere insulin [88]. Dermed mister α -cellene insulinets hemmende effekt på glukagonsekresjonen, som fører til forhøyede glukagonkonsentrasjoner, såkalt hyperglukagonemi [89]. Ved T1DM og alvorlig T2DM kan dette reverseres ved tilførsel av eksogent insulin [90].

Unger og Cherrington går så langt som å si at det ikke finnes noen diabetessykdom uten hyperglukagonemi, og at insulin er sekundært i forhold til glukagon ved utvikling av hyperglykemi [89].

1.4 Inkretinhormoner

Tarmen spiller en viktig rolle i glukosemetabolismen. Oralt glukoseinntak fører til en høyere insulinrespons enn ved intravenøs glukoseinfusjon som gir tilsvarende plasmaglukosekonsentrasjon (isoglykemi). Se Figur 1.2 [91]. Denne effekten kalles inkretineffekten, og blir mediert av inkretinhormonene glukoseavhengig insulinotropt peptid (GIP) og glukagon-liknende peptid 1 (GLP-1). Dette er peptidhormoner som utskilles fra tarmen i respons på næringsinntak, og spiller en nøkkelrolle i regulering av øyccelfunksjonen og dermed glukosemetabolismen. Avhengig av størrelsen på stimulusen kan inkretineffekten stå for inntil 70 % av insulinresponsen hos friske [91]



Figur 1.2: Inkretineffekten.

Plasmaglukosekonsentrasjoner etter oralt glukoseinntak og isoglykemisk glukoseinfusjon sees til venstre, og tilsvarende insulinkonsentrasjoner til høyre [92].

1.4.1 Utskillelse

GIP blir produsert og utskilt fra K-celler som fortrinnsvis er lokalisert i proksimale deler av tynntarmen og med høyest tetthet i duodenum, mens GLP-1 blir produsert og utskilt fra L-celler som har høyest tetthet i ileum og kolon [93]. Mortensen *et al.* har vist at begge celletyper er spredt ut over hele tarmen, og det er også evidens for at det finnes en populasjon av celler der både GIP og GLP-1 er kolokalisert og at begge hormoner blir utskilt samtidig [94]. I en studie der sekresjonen av insulin, GLP-1 og GIP ble undersøkt, ble det vist en signifikant korrelasjon mellom sekresjon av GLP-1 og GIP gjennom dagen [95]. Dette tyder på at det er en sammenheng i sekresjonen mellom de to hormonene.

Både K- og L-cellene er endokrine celler som er lokalisert i intestinal mukosa som responderer på direkte kontakt av glukose, fett og proteiner som fordøyes i tarmen [93]. Det er usikkerhet knyttet til hvordan makronæringsmidler stimulerer utskillelsen av GLP-1 siden det skjer en økning i utskillelsen 5-15 minutter inn i et måltid, når næringsmidlene ikke har rukket å komme til distale deler av tynntarmen som ileum og kolon [96]. Det er forskjellige teorier knyttet til dette. Hovedteorien er at makronæringsstoffer påvirker lumenale reseptorer. En annen teori er at GIP, som blir sekret fra proksimale deler av tarmen, når de mer distale L-cellene via blodstrømmen som igjen stimulerer sekresjon av GLP-1. Dette har blitt observert i rotte [97], men det er ikke bekreftet i menneske [98]. En tredje teori er at GIP-utskillelse stimulerer vagusnerven som direkte stimulerer L-cellene til å skille ut GLP-1 [99].

Når GIP og GLP-1 blir skilt ut i blodbanen blir de hurtig degradert av enzymet dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) [100]. GIP har en halveringstid på 7 minutter, mens GLP-1 har en halveringstid på 3-5 minutter [101, 102].

1.4.2 Effekter på glukosemetabolismen

Både GIP og GLP-1 har like store effekter på insulinsekresjonen ved måltid, men siden GLP-1 sekreseres i lavere konsentrasjoner enn GIP, regnes GLP-1 som en av de mest insulinotrope substansene som finnes [103]. Både GIP og GLP-1 øker genekspresjonen av proinsulin slik at mengden insulin i β -cellene øker [104]. GLP-1 virker som en potent hemmer av α -cellenes sekresjon av glukagon [105], mens GIP øker glukagonsekresjonen [100]. Ved inntak av karbohydrater øker sekresjonen av GLP-1 og GIP som gir økt insulin- og redusert glukagonsekresjon hos friske. [106].

1.4.3 Legemidler som påvirker inkretinsystemet

På grunn av inkretinhormonenes potente insulinotrope effekt og GLP-1s glukagonostatiske effekt, er det gunstig å påvirke disse farmakologisk. Det er to effektive måter å påvirke inkretinsystemet på for å bedre blodsukkerkontrollen; enten ved hemming av DPP-4, enzymet som bryter ned både GLP-1 og GIP, som medfører økte konsentrasjoner av de endogene hormonene, eller ved bruk av GLP-1-reseptoragonister.

DPP4-hemmere

DPP4-hemmere virker antidiabetisk via en glukoseavhengig effekt, noe som medfører lav risiko for hypoglykemiske episoder. En annen fordel med denne medikamentgruppen er at de ikke fører til vekt oppgang. DPP4-hemmerne er formulert som perorale tabletter. I Norge er det fire forskjellige DPP4-hemmere på markedet: Sitagliptin (Januvia[®]), vildagliptin (Galvus[®]), saksagliptin (Onglyza[®]) og linagliptin (Trajenta[®]). Flere av disse finnes også som kombinasjonstabletter med metformin.

GLP-1 reseptoragonister

GLP-1-reseptor agonistene virker stimulerende på β -cellene i pankreas, og virker hemmende på glukagonsekresjon. Dette er peptid-analoger som har mye lengre halveringstid enn GLP-1. Siden disse legemidlene er peptider kan de ikke administreres peroralt, som DPP4-hemmerne, på grunn av enzymatisk degradering i gastrointestinal-traktus. Derfor må disse medikamentene injiseres subkutan [71]. I Norge er det tre virkestoff tilgjengelig på markedet; liraglutid (Victoza[®]), lixisenatid (Lyxumia[®]) og eksanetid (Bydureon[®] og Byetta[®]). Disse må administreres subkutan én til to ganger daglig, med unntak av Bydureon[®] som administreres på én fast dag i uka.

1.5 Momenter i forsøksoppsettet

1.5.1 Hyperglykemisk clamp

Redusert sekresjon av insulin fra β -cellene er som tidligere nevnt en viktig patofysiologisk mekanisme i utviklingen av PTDM (og T2DM) [57]. Gullstandarden for å kvantifisere glukosemediert insulinsekresjon er å utføre en hyperglykemisk clamp [107]. Samtidig kan man måle suppresjonen av glukagonsekresjonen. Metoden utføres ved å øke plasmaglukosekonsentrasjonen hurtig via en bolusinfusjon av glukose, for så å stabilisere ("clampe") plasmaglukosekonsentrasjonen ved en gitt forhøyet konsentrasjon via en kontinuerlig glukoseinfusjon. Ved å måle plasmaglukosekonsentrasjonen, e.g. hvert 5. minutt, justeres infusjonshastigheten av glukose (via negativ feedback) slik at variasjonen rundt målkonsentrasjonen av plasmaglukose blir så liten som mulig [108]. På denne måten kan forsøkspersonenes insulin- og glukagonsekresjon kvantifiseres ved en bestemt hyperglykemi over tid (da disse effektene ikke kan undersøkes ved fastende glukosekonsentrasjoner alene), og intervariabilitet samt intravariabilitet (e.g. ved infusjon av GLP-1) kan sammenliknes [107, 108].

Insulinsensitivitet kan også estimeres fra en hyperglykemisk clamp, da det etter en periode vil være en relativt konstant insulinkonsentrasjon, med en likevekt mellom glukose tatt opp i vev og samtidig infusjonshastighet av glukose. Ved å korrigere for samtidig insulinkonsentrasjon får man et estimat på insulinsensitivitet [108-110].

En hyperglykemisk clamp måler individuell respons i pankreas på forhøyet plasmaglukose, men gir ikke et komplett bilde av total mengde glukagon og insulin som er tilgjengelig (restkapasitet) i henholdsvis α - og β -celler. Dette kan undersøkes ved å utføre en arginintest.

1.5.2 Arginintest

En bolusinjeksjon av aminosyren arginin gir en umiddelbar, glukose-uavhengig og total sekresjon av glukagon og insulin fra pankreas. Dette gir en god surrogat-indikator på α - og β -cellenes sekretoriske kapasitet [111, 112]. Ved å utføre en arginintest mot slutten av en hyperglykemisk clamp, kan restkapasiteten pankreas har til å skille ut glukagon og insulin fra α - og β -cellene estimeres [112].

1.6 Studiens hensikt

Nyretransplanterte pasienter med PTDM har økt risiko for tidlig kardiovaskulær sykdom og død. Det er derfor ønskelig å få mer kunnskap om den underliggende patofysiologien til PTDM, da den ikke er fullstendig klarlagt. Slik kunnskap vil være nyttig for å finne bedre antidiabetiske behandlingsalternativ for pasienter med PTDM.

I denne studien ble glukosemetabolismen til nyretransplanterte pasienter med PTDM undersøkt i detalj og sammenliknet med nyretransplanterte pasienter med normal glukosetoleranse for å se om PTDM er en bihormonell sykdom; ikke bare karakterisert av insulinresistens og redusert insulinsekresjon, men også forhøyet glukagonsekresjon (hyperglukagonemi)

Det primære målet med studien var å undersøke om pasienter med PTDM har forhøyet fastende glukagonkonsentrasjon med påfølgende redusert glukosemediert glukagonsuppresjon. De sekundære målene var å undersøke effekter av GLP-1 på insulin- og glukagonsekresjon ved henholdsvis fastende og forhøyede plasmaglukosekonsentrasjoner (hyperglykemisk clamp), insulinsensitivitet, samt restkapasiteten pankreas har til å sekreere glukagon og insulin fra α - og β -cellene etter en hyperglykemisk clamp ved å gjennomføre en arginintest; da arginin gir en glukoseuavhengig sekresjon av begge hormoner.

Deretter ble journal og epikriser gjennomgått med hensyn på inklusjon- og eksklusjonskriterier, før pasientene ble kontaktet av professor, overlege Trond Jenssen eller professor, overlege Karsten Midtvedt, med forespørsel om deltagelse i studien.

Studien ble utført i henhold til Helsinkideklarasjonen, "good clinical practice" (GCP) og norske lover og guidelines. Den er godkjent av Regional etisk komité (REK) (Appendiks AV). Pasientene mottok både muntlig og skriftlig informasjon om studien, og pasientene signerte et informert samtykke før studien ble satt i gang. Pasientene kunne når som helst og uten begrunnelse trekke samtykket tilbake. Alt dette i henhold til Helsinkideklarasjonen. Pasientenes reise og eventuell overnatting i forbindelse med forsøksdagene ble dekket, men pasientene fikk ingen økonomisk kompensasjon ut over dette.

Nyretransplanterte pasienter ble inkludert i henhold til disse kriteriene:

Inklusjonskriterter:

- Nyretransplantert minst 1 år før inklusjon
- PTDM-gruppe: Diagnostisert med PTDM med fastende plasmaglukose $> 7,0$ mmol/L og/eller 2-timers plasmaglukose $\geq 11,1$ mmol/L etter oral glukosetoleransetest
- Kontrollgruppe: Fastende plasmaglukose $< 6,1$ mmol/L og 2-timers plasmaglukose $< 7,8$ mmol/L etter oral glukosetoleransetest
- Stabil nyrefunksjon (mindre enn 20 % variasjon i serum kreatinin siste 2 måneder)
- Stabil prednisolondose: ≤ 5 mg/døgn siste 2 måneder
- > 18 år
- BMI 18,5-29,9 kg/m²
- Signert skriftlig informert samtykke

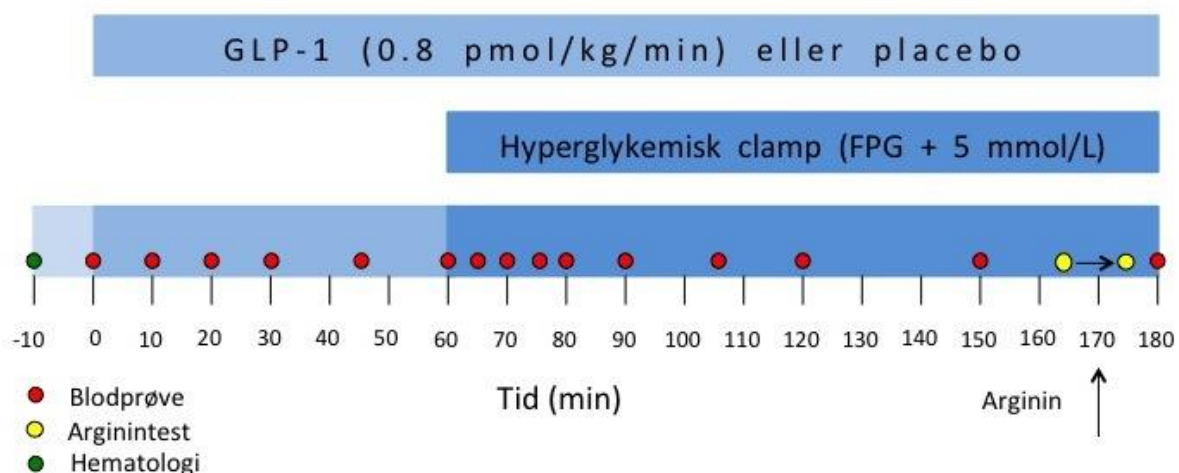
Eksklusjonskriterier:

- Alvorlig leversykdom
- Akutt eller kronisk hepatitt
- Tidligere mageinnsnevring
- Inflammatorisk tarmsykdom
- Tidligere eller aktuell malignitet
- Gravide eller ammende mødre

I løpet av studien møtte hver enkelt pasient opp til to forsøksdager med 2-4 ukers mellomrom. PTDM-pasienter behandlet med orale antidiabetika hadde 7 dager med utvasking før hver forsøksdag. Undersøkelsene på forsøksdagene bestod av blodprøver, blodtrykk, veiing av kroppsvekt samt en hyperglykemisk clamp med samtidig infusjon av GLP-1/placebo etterfulgt av en arginintest. Disse undersøkelsene ble repetert og utført på nøyaktig samme måte ved andre forsøksdag. Pasientene ble randomisert ved trekning før første forsøksdag til hvilken infusjon de skulle få ved siden av clamp: GLP-1 eller placebo. Ved andre undersøkelsesdag ble det motsatt gitt, som vist i Figur 2.1.

2.3 Forsøksdagene

Begge forsøksdagene bestod av tre hovedelementer: Infusjon av GLP-1 eller placebo i forsøkets 180 minutter, en hyperglykemisk clamp fra tid $t = 60$ -180 minutter og en arginintest fra tid $t = 170$ -180 minutter. På hver forsøksdag ble det lagt inn et venekateter (BD Venflon TM Pro) i albuehasen for infusjon av glukose, GLP-1/placebo og arginin før forsøket ble igangsatt. I motsatt albuehase ble det lagt inn et tilsvarende venekateter for blodprøvetaking. Blodprøvearmen ble pakket i en varmemansjett for "arterialisering" av blodet [113]. Hos pasienter med AV-fistel ble blodprøvene tatt fra armen uten fistel.



Figur 2.2: Oversikt over forsøksdagen

Infusjon med GLP-1/Placebo ble startet umiddelbart etter første blodprøve. Hyperglykemisk clamp ble startet etter 60 minutter. Den vertikale pilen indikerer tidspunktet arginintesten ble igangsatt med tilhørende blodprøver ved tiden $t = 165, 169, 172, 173, 174$ og 175 minutter (indikert med horisontal pil).

FPG; fastende plasmaglukosekonsentrasjon, GLP-1; glukagonliknende peptid-1

2.3.1 GLP-1/Placebo

Pasientene ble randomisert til administrasjon av henholdsvis GLP-1 eller placebo (0,9 % NaCl) før første forsøksdag. Ved andre forsøksdag ble det motsatte administrert som vist i Figur 2.1.

GLP-1 infusjonen ble gjort i stand umiddelbart før forsøkets start på følgende måte:

- 1 mL 0,9 % NaCl ble trukket ut fra en 50 mL Braun Ecoflac+ flaske (B. Braun Melsungen AB, Germany) og ble tilsatt en vial med 100 µg GLP-1 (7-36) amid acetat (Clinalfa Basic, Bachem Distribution Services GmbH, Germany).
- Deretter ble ytterligere 12,2 mL 0,9 % NaCl tatt ut av flasken (totalt 13,2 mL)
- 0,7 mL (70 µg) ble trukket ut av vial og tilsatt flasken
- 12,5 mL humant albumin (Albunorm, Octapharma) ble tilsatt flasken
- Totalvolumet på 50 mL ble blandet godt og trukket opp i 50 mL Braun Omnifix® sprøyte (B. Braun Melsungen AB, Germany)

Dette ga en totalkonsentrasjon av GLP-1 på 42,45 nmol/mL. På forsøksdagen ble det ut i fra pasientens vekt beregnet hvor mange mL pasienten skulle få infundert for å holde infusjonshastigheten på 0,8 pmol/kg/min gjennom hele forsøket. På placebodagen ble tilsvarende volum 0,9 % NaCl (B. Braun Melsungen AB, Germany) administrert på samme måte som GLP-1. Infusjonene ble gitt via Braun Perfusor® Space sprøytepumpe i en Green line® 150 cm slange (Codan Medizinische Geräte GmbH and Co KG, Lensahn) tilkoblet venekateteret i pasientens infusjonsarm.

2.3.2 Hyperglykemisk clamp

Den hyperglykemiske clampen ble startet ved tid $t = 60$ minutter hvor det ble gitt bolusdose av glukose på 200 mg/kg over 5 minutter. Deretter ble plasmaglukosekonsentrasjonen holdt stabilt 5 mmol/L over den individuelle fastende plasmaglukosekonsentrasjonen som ble målt ved tiden $t = 0$ minutter. Infusjonshastigheten ble så justert via negativ feedback basert på plasmaglukosekonsentrasjoner målt hvert 5. minutt. Infusjonshastigheten ble notert gjennom hele forsøket. Ved injeksjon av arginin ble glukoseinfusjonen stanset i tiden $t = 170-171$ minutter og deretter startet opp igjen og gitt helt til forsøkets slutt ved tiden $t = 180$ minutter. Glukose ble infundert fra 500 mL infusjonsposer med 200 mg/mL glukose (Glucos Fresenius

Kabi) via volumpumpe (Braun Infusomat[®] Space) tilkoblet en slange (Braun Space Line type IV standard, Luer Lock) som var tilkoblet venekateteret i infusjonsarmen.

2.3.3 Test av restkapasitet i pankreas

Ved tiden $t = 170$ minutter ble det gitt en infusjon av 23,7 mL (Braun Omnifix[®] sprøyter) Arginin NAF 1 mmol/mL (Argininhydroklorid, konsentrat til infusjonsvæske, 100 mL hetteglass) tilsvarende 5 gram arginin over 1 minutt. Det ble etterskylt med 20 mL 0,9 % NaCl (Braun) fra Braun Omnifix[®] sprøyte. Sprøytene ble trukket opp umiddelbart før injeksjon.

2.4 Prøvetakning

Blodprøver ble tatt fra venekateteret innlagt i albuehasen.

2.4.1 Hematologiske parametere

Før forsøkets start ble fastende blodprøver tappet på EDTA-rør for analyse av hematologiske parametere som HbA1c samt blodkonsentrasjon av immunosuppressiva (CsA, Tac, everolimus, mykofenolat). Blodprøver til analyse av parametere i serum som kreatinin ble tatt på heparin-rør tilsatt gel. Disse prøvene ble analysert ved Avdeling for medisinsk biokjemi, OUS Rikshospitalet.

2.4.2 Plasmaglukose

En dråpe blod ble trukket ut med 1 mL Braun Omnifix[®] sprøyte ved tiden $t = 0$ minutter. Konsentrasjonen av fastende plasmaglukose ble deretter målt ved å bruke ferskt fullblod på et plasmakalibrert glykometer (HemoCue glucose 201, Ängelholm, Sverige). Da den hyperglykemiske clampen ble startet ved tiden $t = 60$ minutter ble plasmaglukosekonsentrasjonen målt hvert 5. minutt til og med forsøkets slutt ved tiden $t = 180$ minutter. Det ble i tillegg målt en plasmaglukosekonsentrasjon ved tiden $t = 55$ minutter ved henholdsvis 5 forsøksdager for henholdsvis PTDM-pasienter med GLP-1 infusjon og PTDM-pasienter med placeboinfusjon, samt 4 forsøksdager for kontrollerpasienter med GLP-1 infusjon og 5 forsøksdager for kontrollpasienter med placeboinfusjon. Denne plasmakonsentrasjonsmålingen stod ikke i den opprinnelige protokollen, men det ble oppdaget at det disse dataene kunne bidra i analysen av resultatene.

2.4.3 Glukagon

Blodprøver til analyse av glukagon ble samlet gjennom hele forsøket ved tid $t = 0, 10, 20, 30, 45, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 105, 120, 150, 165, 169, 172, 173, 174, 175$ og 180 minutter, som vist i Figur 2.2. Blodprøvene ble tappet på 9 mL K3EDTA-rør (Greiner bio-one, Kremsmünster, Østerrike). Disse rørene var tilsatt en spesifikk DPP-4-hemmer, valine-pyrrolidide, slik at senere analyse av GLP-1-konsentrasjoner kunne tillates. Tilsetningen av valine-pyrrolidine ble gjort ved å avveie 80 mg tørrstoff som ble oppløst i 130 mL deionisert vann, til tilnærmet 1 mmol/L. Deretter ble 90 μ L tilsatt hvert 9 mL EDTA-rør som ga en sluttkonsentrasjon på 0,01 mmol/L etter tapping av blod. EDTA-rørene ble holdt på is før og etter blodprøvetaking.

Ved forsøkets slutt ble EDTA-rørene sentrifugert i 20 minutter ved 1200 RCF og 4 °C. Deretter ble plasma avpipetert og fordelt på tre 2 mL mikrotube-rør (Sarstedt). Disse ble oppbevart ved -20 °C frem til analyse.

2.4.4 Insulin

Blodprøver til analyse av insulin ble tatt på samme tidspunkt som blodprøvene til analyse av glukagon. Se Figur 2.2. Blodprøvene ble tappet på 2,5 mL Z Serum Sep Clot Activator-rør (Greiner bio-one, Kremsmünster, Østerrike) før de ble satt til å koagulere ved romtemperatur. Ved forsøkets slutt ble rørene sentrifugert i 10 minutter ved 1800 RCF. Deretter ble serum avpipetert og fordelt på to 1,5 mL mikrotube-rør (Sarstedt) før de ble lagret ved -20 °C frem til analyse.

2.4.5 Blodtrykk

Blodtrykk ble målt umiddelbart etter forsøkets slutt, mens pasientene fortsatt var sengeliggende. Blodtrykket ble målt tre ganger ved bruk Phillips Intelli Vue MX450 (Phillips Medizin Systeme, Boeblingen GmbH, Hewlett-Packard – str 2, Germany), der gjennomsnittet av de to siste målingene ble benyttet.

2.5 Analyser

Analysene av glukose ble gjort ”bed side” med et håndholdt apparat mens henholdsvis serum- og plasmakonsentrasjoner av insulin og glukagon ble utført eksternt på frosne prøver. Insulin ble analysert ved Metabolsk og nyremedisinsk forskningslaboratorium, Universitetet i Tromsø, mens glukagon ble analysert ved Biomedisinsk Institutt, Universitetet i København.

2.5.1 Glukose

Glukose ble målt ved å analysere ferskt fullblod på et plasmakalibrert glykometer (HemoCue glucose 201, Ängelholm, Sverige).

2.5.2 Insulin

Insulinkonsentrasjoner i serumprøvene ble bestemt ved å benytte et ”enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA)-kit (EIA-2935, DRG International, Inc., NJ, USA). Denne analysen baserer seg på sandwich-prinsippet og benytter monoklonale antistoff med følgende kryssreaktivitet; svine-insulin >100 %, bovint insulin >100 %, hunde-insulin 82 % og hare-insulin 63 %. Den analytiske sensitiviteten var 1,76 µIU/mL. Analysen hadde en variasjonskoeffisient for ”intra-assay” reproduserbarhet mellom 1,8-2,6 %, samt ”inter-assay” variasjonskoeffisient mellom 2,9-6,0 %. Kitets ”dynamic range” var mellom 1,76-100 µIU/mL (12,22-694,5 pmol/l) i henhold til leverandøren. Alle prøver med insulinkonsentrasjoner antatt over enn 100 µIU/mL (694,5 pmol/l) ble fortynnet før analyse, og prøver som ved analyse viste seg å ligge utenfor standardrekken (over 100 µIU/mL) ble reanalysert etter passende fortynning. Insulinprøven ved t = 75 minutter ble ikke analysert.

2.5.3 Glukagon

Plasmaprøvene ble analysert i et kit som benytter antistoff som er spesifikt mot det C-terminale glukagonmolekylet (antistoff kode nr 4305). Dette sikrer at det blir målt glukagon som blir dannet i pankreas [114]. Antistoffet viste ingen kryssreaktivitet med glicentin (proglukagon 1-69) eller oxyntomodulin. Proglukagon 1-61 som blir dannet i små mengder i pankreas og tarmen, har total kryssreaktivitet med dette antistoffet [62]

2.6 Beregninger

2.6.1 Glukosemediert glukagonsuppresjon

Glukosemediert glukagonsuppresjon ble beregnet som individuell reduksjon fra gjennomsnittlig glukagonkonsentrasjon ved tiden $t = 0-60$ minutter (baseline) til gjennomsnittlig glukagonkonsentrasjon ved tiden $t = 150-169$. Begge gjennomsnittskonsentrasjonene ble beregnet som arealet under kurven (AUC) i de respektive tidsrommene (formel 1 under) dividert på de respektive tidene (formel 2).

Trapesmetoden for å beregne AUC:

$$AUC = \sum ((C_1 + C_2) / 2) \times \Delta \text{tid} \quad (1)$$

Gjennomsnittskonsentrasjon via AUC:

$$\text{Gjennomsnittlig konsentrasjon} = AUC / \text{tid} \quad (2)$$

Maksimal glukagonsuppresjon fra baseline (i prosent) ble beregnet som:

$$(\text{Glukosemediert glukagonsuppresjon} / (AUC_{0-60} / 60)) * 100 \% \quad (3)$$

2.6.2 Glukosemediert insulinsekresjon

Økning i insulinsekresjon ble beregnet i samme tidsrom og på samme måte som glukosemediert glukagonsuppresjon.

Maksimal insulinsekresjon fra baseline (i prosent) ble beregnet som:

$$(\text{Glukosemediert insulinsekresjon} / (AUC_{0-60} / 60)) * 100 \% \quad (4)$$

2.6.3 Fastende konsentrasjoner av glukagon og insulin

Median plasmakonsentrasjon ble beregnet for glukagon og insulin fra prøven tatt ved tid $t = 0$ minutter, fra både placebo- og GLP-1 forsøksdagene.

2.6.4 Insulinsekresjon

Første fase (1. fase) insulinsekresjon ble beregnet som gjennomsnittlig insulinkonsentrasjon ved tidspunktene $t = 65$ og 70 minutter. Andre fase (2. fase) insulinsekresjon ble beregnet som gjennomsnittlig insulinkonsentrasjon ved tidspunktene $t = 150, 165$ og 169 minutter.

2.6.5 Effekt av GLP-1 på insulin og glukagonsekresjon ved fastende plasmaglukose

GLP-1s effekt på insulin- og glukagonsekresjon ble beregnet ved å sammenlikne forskjeller i hormonenes AUC_{0-60} ved henholdsvis placebo- og GLP-1 infusjon, dvs, mellom tiden $t = 0-60$ min (før hyperglykemisk clamp). AUC_{0-60} for både insulin og glukagon ble beregnet med trapesmetoden (se formel 1 over).

2.6.6 Hyperglykemisk effekt ved GLP-1 infusjon

Effekt av økte plasmaglukosekonsentrasjoner på insulin- og glukagonsekresjon ved samtidig GLP-1 infusjon (under hyperglykemisk clamp) ble beregnet ved å sammenlikne AUC_{60-169} for begge hormoner (formel 1)

2.6.7 Akutt insulin- og glukagonrespons

Akutt glukagonrespons (AGR) og akutt insulinrespons (AIR) etterfulgt av arginintesten ved tid $t = 170$ minutter, ble beregnet som den individuelle absolutte økningen i gjennomsnittskonsentrasjon av insulin og glukagon fra tid $t = 165$ og 169 minutter (pre-arginin) til gjennomsnittskonsentrasjon av tilsvarende hormon ved tid $t = 172, 173, 174$ og 175 minutter (post-arginin) [111].

2.6.8 Insulinsensitivitet

Når 2. fase insulinsekresjon flater ut under en hyperglykemisk clamp er insulinkonsentrasjonen jevn, og det vil oppstå en likevekt der mengde glukose infundert er lik mengde glukose absorbert i vevet. Ved å korrigere for samtidige insulinkonsentrasjoner kan insulinsensitiviteten (ISI) beregnes [109]. ISI ble beregnet individuelt ved hver placeboforsøksdag ved å ta gjennomsnittlig mengde glukose infundert (M) ved tid $t = 150-169$ minutter dividert på gjennomsnittlig insulinkonsentrasjon (I) i samme tidsrom (formel 5 under).

$$ISI = M/I \quad (5) [109]$$

$$M = \text{glukose } (\mu\text{mol}) / \text{per kg kroppsvekt} / \text{minutt} \quad (6)$$

$$I = \text{insulinkonsentrasjon } (\text{pmol/l})$$

2.6.9 Plasmaglukose under hyperglykemisk clamp

Median plasmaglukose under clamp ble beregnet som median av gjennomsnittlig konsentrasjon i tidsrommet $t = 70\text{-}169$ minutter for hvert enkelt forsøk.

2.6.10 Nyrefunksjon

Pasientenes nyrefunksjon (glomerulær filtrasjonsrate, GFR) ble estimert med 4-variabel "Modification of Diet in Renal Disease" (MDRD)-formelen (formel 7) ved hver forsøksdag [115].

$$eGFR (\text{mL} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2) = 186 \times (S_{\text{Kreatinin}} (\mu\text{mol/L}) \times 0,011312)^{-1,154} \times (\text{alder } (\text{år}))^{-0,203} \quad (7)$$

Dersom svart hudfarge: $\times 1,212$

Dersom kvinne: $\times 0,742$

2.7 Statistikk

2.7.1 Antall pasienter

I følge litteraturen ble det antatt at PTDM-gruppen ville ha $30 \% \pm 15 \%$ gjennomsnittlig høyere fastende (baseline) plasmaglukagonkonsentrasjoner enn kontrollgruppen, med en korresponderende forskjell under GLP-1 induisert glukagonsuppresjon [116]. For å sikre en teststyrke ("power") på 90 % for å kunne vise en forskjell ved 5 % signifikansnivå, var det behov for 20 pasienter. Vi inkluderte 24 pasienter (12 i hver gruppe) for å tillate 20 % "drop-out" fra studien.

2.7.2 Statistiske metoder

Alle kvantitative data ble sjekket for normalitet med Shapiro-Wilks' test i SPSS versjon 20 (IBM Corp, Armonk, NY, USA). Da ingen data var konsekvent normalfordelte, ble alle data analysert med ikke-parametriske tester i GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA); Mann-Whitney U test ble benyttet for uparede analyser, mens Wilcoxon matched pairs signed rank test ble benyttet for parede analyser. For korrelasjonsanalyser ble Spearman r benyttet. Alle data er gjengitt som median (IQR) hvis ikke annet er angitt.

Funn med en P-verdi $< 0,05$ ble regnet som statistisk signifikante.

Alle signifikante parede analyser ble oppgitt med P-verdier på $< 0,05$, $\leq 0,01$ og $\leq 0,001$.

2.7.3 Grafer

Grafer ble laget i GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)

3 Resultater

3.1 Pasienter

12 nyretransplanterte pasienter med PTDM og 12 nyretransplanterte pasienter med normal glukosetoleranse ble inkludert og fullførte studien. Matchingen av pasientene i kontrollgruppen med pasientene i PTDM-gruppen med hensyn på alder, kjønn, BMI og nyrefunksjon var vellykket (ingen signifikante forskjeller mellom gruppene). Gruppene var også like med hensyn på andre demografiske data, bortsett fra tid siden transplantasjon, som var signifikant lenger for pasientene i PTDM-gruppen. Ved inklusjon hadde syv av pasientene i PTDM-gruppen etablert behandling med ett eller flere perorale antidiabetikum, men ingen fikk insulin. Det var ingen signifikante forskjeller i immunsuppressiv behandling eller blodkonsentrasjoner av immunsuppressiva mellom gruppene. Se Tabell 3.1.

Tabell 3.1: Demografiske data og blodkonsentrasjoner/døgndose av immunsuppressiva, oppgitt i median (IQR) eller antall

	PTDM N = 11	Kontroll N = 12	P-verdi
Alder	63 (54-70)	66,0 (57-73)	0,39
Menn/kvinner	9/2	10/2	
BMI (kg/m ²)	26,6 (25,8-29,6)	25,7 (24,2-30,5)	0,37
Tid etter tx (år)	2,5 (1,5-4,8)	1,5 (1,0-1,8)	0,02
Preemptiv tx (ja/nei)	4/7	4/8	
Donor (LD/DD)	4/7	4/8	
Systolisk blodtrykk (mmHg)*	147 (136-152)	139 (132-149)	0,11
Diastolisk blodtrykk (mmHg)*	82 (76-88)	78 (72-87)	0,30
eGFR (mL/min/1,73m ²)*§	67 (64-74)	61 (47-73)	0,14
Bruk av oralt antidiabetikum (ja/nei)	7/4	0/12	
Takrolimus	6	9	
Konsentrasjon; takrolimus (µg/L)*	5,5 (4,9-8,0)	6,0 (4,8-7,0)	0,90
Ciklosporin	4	2	
Konsentrasjon; Ciklosporin (µg/L)*	73 (69-106)	93 (71-110)	0,59
Everolimus	1	1	
Konsentrasjon; Everolimus (µg/L)*	ND	ND	
Mykofenolatmofetil	9	10	
Mykofenolat natrium	2	1	
Konsentrasjon; Mykofenolat (mg/L)*	1,9 (1,2-2,6)	2,6 (1,8-3,1)	0,08
Prednisolon	10	12	
Dose; prednisolon (mg/døgn)	5,0 (5,0-5,0)	5,0 (5,0-5,0)	> 0,99

BMI; kroppsmasseindeks, DD; avdød donor, eGFR; estimert glomerulær filtrasjonsrate, LD: Levende donor, tx: Transplantasjon. 1 pasient i PTDM-gruppen ble ekskludert fra analysene

*Median fra begge forsøksdagene, §eGFR beregnet med 4-variabel MDRD [115].

Ingen studiedeltakere var diagnostisert med diabetes mellitus før transplantasjon. En pasient i PTDM-gruppen hadde normale glukosekonsentrasjoner på begge forsøksdagene (FPG: på 4,6 mmol/L og 5,4 mmol/L, HbA1c; 6,3 % og 6,0 %) og ble dermed ekskludert fra videre analyser. Median fastende plasmaglukose (FPG) og HbA1c var signifikant høyere i PTDM-gruppen enn kontrollgruppen. Fastende plasmaglukose ved t = 55 (gjort på en del av pasientene) indikerer at plasmaglukosen falt ved infusjon av GLP. Se Tabell 3.2.

Tabell 3.2: Glukoseparametere ved forsøksdagene og endring i FPG fra tid t=0 til t=55 (før start av hyperglykemisk clamp), oppgitt i median (IQR)

	PTDM N = 11	Kontroll N = 12	P-verdi
HbA1c* (%)	6,8 (6,6-7,6)	5,7 (5,6-6,0)	< 0,001
C-peptid* (pmol/L)	1399 (1082-1660)	1142 (972-1537)	0,15
FPG total* (mmol/L)	8,0 (6,9-8,4)	5,2 (4,9-5,8)	< 0,001
FPG _{t=0} ; placebo (mmol/L)	7,3 (6,1-7,8)	4,8 (4,6-5,4)	< 0,001
FPG _{t=55} ; placebo (mmol/L)	6,2 (6,1-6,2) n=5	4,8 (4,3-5,4) n=5	0,008
FPG _{t=0} ; GLP-1 (mmol/L)	6,9 (6,4-7,9)	4,8 (4,3-5,4)	< 0,001
FPG _{t=55} ; GLP-1 (mmol/L)	4,9 (4,5-5,6) n=5	3,5 (3,4-3,5) n=4	0,016
FPG _{t=0} - FPG _{t=55} ; placebo (mmol/L)	0,5 (0,1-1,3) n=5	0,0 (-0,3-0,4) n=5	0,14
FPG _{t=0} - FPG _{t=55} ; GLP-1 (mmol/L)	2,2 (1,5-2,8) n=5	1,3 (1,1-1,7) n=4	0,06
P-verdi ^a	0,25 n=4	0,13 n=4	

FPG; fastende plasmaglukosekonsentrasjon, GLP-1; glukagonliknende peptid-1, HbA1c; glykosylert hemoglobin

^aP-verdi av deltaverdiene innad i gruppene for reduksjon i fastende plasmaglukose fra t = 0 til 55 min

*Median for begge forsøksdagene

N-verdier er oppgitt ved FPG_{T=55} da ikke dette ble målt ved alle forsøksdagene

Median plasmaglukosekonsentrasjon under hyperglykemisk clamp ved placeboinfusjon for PTDM- og kontrollgruppen var 12,3 (11,5-13,1) og 9,8 (9,6-10,4) mmol/L (P < 0,001), tilsvarende konsentrasjoner ved GLP-1 infusjon var 11,8 (11,2-12,7) mot 9,6 (9,1-10,1) mmol/L (P < 0,001). Disse konsentrasjonene samsvarer med korresponderende median fastende plasmaglukose ved t = 0 (Tabell 3.2).

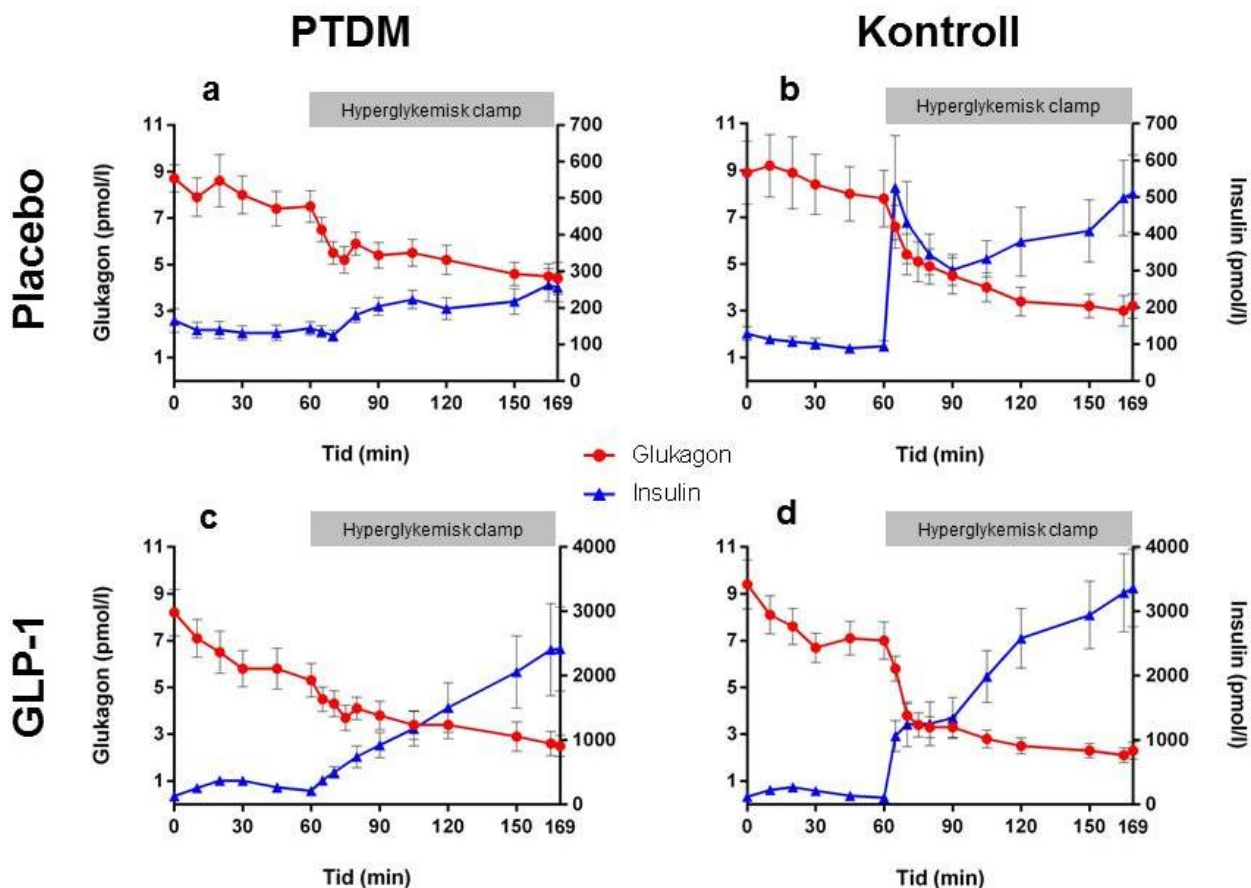
3.2 Glukagon og insulin

Gruppene viste ingen signifikante forskjeller i median fastende konsentrasjon av verken glukagon (PTDM; 8,0 (7,0-9,5) pmol/L, kontroll; 8,0 (6,0-12,8) pmol/L, $P = 0,87$) eller insulin (PTDM; 127 (94-193) pmol/L, kontroll; 122 (67-171) pmol/L, $P = 0,50$). Det var heller ingen forskjeller i AUC_{0-60} (fra forsøkets start til hyperglykemisk clamp) mellom gruppen for henholdsvis glukagon ($P = 0,60$) og insulin ($P = 0,24$). Se Figur 3.1 a og b, samt Tabell 3.3.

Pasientene i PTDM-gruppen hadde en signifikant dårligere glukosemediert glukagonsuppresjon. I forbindelse med hyperglykemisk clamp ble glukagon redusert med 42 % i PTDM-gruppen sammenliknet med 68 % i kontrollgruppen ($P < 0,001$). PTDM-gruppen viste også en signifikant lavere 1. fase insulinsekresjon ($P < 0,001$), samt redusert evne til å øke insulinsekresjonen fra baseline til slutten av clampen sammenliknet med kontrollgruppen (74 (56-108) % mot 319 (198-717) %, $P < 0,001$). Det var også en tendens til at PTDM-gruppen hadde lavere insulinsekresjon beregnet med AUC_{60-169} (19,8 (12,5-32,9) nmol*min/L, mot 32,9 (22,2-58,2) nmol*min/L, $P = 0,05$) Se Figur 3.1 og Tabell 3.3.

Infusjon av GLP-1 førte til en signifikant reduksjon i glukagonsekresjonen ved fastende plasmaglukosekonsentrasjoner (tid $t = 0-60$) i PTDM-gruppen ($P \leq 0,001$). Forandringen i AUC_{0-60} var på 24 %, fra 435 til 330 pmol*min/L. Glukagonsekresjonen ble ikke signifikant påvirket av GLP-1 i kontrollgruppen, AUC_{0-60} 391 (355-687) og 360 (346-573) pmol*min/L, $P = 0,08$. GLP-1 induserte også en signifikant økt insulinsekresjon både i PTDM-gruppen og kontrollgruppen; henholdsvis med 6,8 og 5,4 pmol*min/L (P for begge grupper $\leq 0,001$). Se Figur 3.1 og Tabell 3.3

Ved infusjon av GLP-1 førte hyperglykemi til en signifikant økning i 1. fase insulinsekresjon både i PTDM- og kontrollgruppen (P for begge grupper $\leq 0,001$), men PTDM-gruppens 1. fase var signifikant lavere enn i kontrollgruppens ($P = 0,001$). PTDM-gruppens evne til å øke insulinsekresjonen fra baseline til slutten av clampen var lavere enn kontrollgruppens (484 (208-897) % mot 1360 (753-2321) %, ($P = 0,005$)). Total insulinsekresjon hos PTDM-gruppen økte med 566 %; fra 19,8 til 112,2 nmol*/L, mens kontrollpasientenes økte med 583 %; fra 32,9 til 191,8 nmol*min/L. Se Figur 3.1 og Tabell 3.3.



Figur 3.1 Glukagon- og insulinkonsentrasjoner (unntatt restkapasitetstesten)
for **a**; PTDM med placebo, **b**; kontroll med placebo, **c**; PTDM med GLP-1 og **d**; kontroll med GLP-1. Tidspunkt for hyperglykemisk clamp er angitt i grått for hver enkelt-figur
Tall er oppgitt som gjennomsnitt \pm SEM

3.3 Restkapasitet i pankreas

Det var ingen forskjell i restkapasiteten pankreas har til å skille ut glukagon, i.e. akutt glukagonrespons (AGR), mellom gruppene. Pasientene i PTDM-gruppen hadde imidlertid en signifikant lavere akutt insulinrespons (AIR) sammenliknet med kontrollgruppen ($P = 0,02$). Se Tabell 3.3.

GLP-1 påvirket ikke pankreas' restkapasitet annet enn en signifikant redusert akutt glukagonrespons i kontrollpasientene ($P \leq 0,01$), men ellers var det ingen signifikante forskjeller ved GLP-1 infusjon. Se Tabell 3.3

Tabell 3.3: Glukagon- og insulinresponser, oppgitt i median (IQR)

	PTDM	Kontroll	P-verdi
Glukagon			
Fastende glukagon (pmol/L)	8,0 (7,0-9,5) ÷	8,0 (6,0-12,8)	0,87
AUC ₀₋₆₀ ; placebo (pmol*min/L)	435 (410-515)	391 (355-687)	0,60
AUC ₀₋₆₀ ; GLP-1 (pmol*min/L)	330 (308-381) ÷	360 (346-573)	0,18
Δ AUC ₀₋₆₀ ; (pmol*min/L)	-96,3 ((-151)-62,9)#	-38,8 (-141-(-1,25))	0,25
AUC ₆₀₋₁₆₉ ; placebo (pmol*min/L)	531 (469-674)	418 (232-584)	0,12
AUC ₆₀₋₁₆₉ ; GLP-1 (pmol*min/L)	331 (259-474)	340 (244-398) ÷	0,96
Δ AUC ₆₀₋₁₆₉ ; (pmol*min/L)	-180 (-250 – (-135)) α	-160 (-231 – (-15))*	0,23
Maksimal suppresjon fra baseline; placebo (%)	42 (30-53)	68 (59-72)	< 0,001
Maksimal suppresjon fra baseline; GLP-1 (%)	ND	ND	ND
Δ Maksimal suppresjon (%)	ND	ND	ND
AGR; placebo (pmol/L)	9,3 (7,5-11,5)	12,6 (9,1-20,0)	0,15
AGR; GLP-1 (pmol/L)	8,8 (6,0-16,0)	9,4 (6,8-14,4)	0,75
Δ AGR (pmol/L)	-1,0 (-3,5-1,2)	-3,7 (-5,4 – (-0,9)) α	0,09
Insulin			
Fastende insulin (pmol/L)	129 (94-193)	122 (67-171)	0,50
AUC ₀₋₆₀ ; placebo (nmol*min/L)	7,7 (4,6-11,8)	6,2 (4,0-8,1)	0,24
AUC ₀₋₆₀ ; GLP-1 (nmol*min/L)	15,8 (8,0-21,7)	11,9 (6,6-14,6)	0,12
Δ AUC ₀₋₆₀ (nmol*min/L)	6,8 (3,3-11,2)#	5,4 (1,7-6,7)#	0,14
AUC ₆₀₋₁₆₉ ; placebo; (nmol*min/L)	19,8 (12,5-32,9), n=11	32,9 (22,2-58,2)	0,05
AUC ₆₀₋₁₆₉ ; GLP-1 (nmol*min/L)	112,2 (61,0-188,9)	191,8 (130,6-295,3)	0,06
Δ AUC ₆₀₋₁₆₉ ; (nmol*min/L)	95,3 (43,5-167,1)#	163,7 (96,4-248,5)#	0,12
Maksimal økning fra baseline; placebo (%)	74 (56-108)	319 (198-717)	< 0,001
Maksimal økning fra baseline; GLP-1 (%)	569 (246-917)	1725 (1050-2877)	0,001
Δ Maksimal økning (%)	484 (208-897)#	1360 (753-2321)#	0,005
AIR; placebo (pmol/L)	656 (489-999)	1194 (764-2012)	0,02
AIR; GLP-1 (pmol/L)	838 (422-1304) ÷	1396 (1021-1871)	0,04
Δ AIR (pmol/L)	354 ((-28)-563)	197 (-256-633)	0,72
1.fase sekresjon; placebo (pmol/L)	134 (90-159)	372 (221-547)	< 0,001
1.fase sekresjon; GLP-1 (pmol/L)	499 (253-566)	815 (653-1356)	0,001
Δ 1.fase sekresjon (pmol/L)	339 (119-447)#	496 (243-854)#	0,051
2.fase sekresjon; placebo (pmol/L)	229 (127-375)	338 (248-689)	0,06
2. fase sekresjon; GLP-1 (pmol/L)	1496 (930-3064)	2756 (1716-4319)	0,13
Δ 2. fase sekresjon (pmol/L)	1332 (753-2969)#	2468 (1337-3725)#	0,30

Forkortelser: AGR; akutt glukagonrespons, AIR; akutt insulinrespons, AUC; areal under kurven, GLP-1; glukagonliknende peptid-1

Fastende konsentrasjoner ble beregnet som median for placebo- og GLP-1 forsøk

Resultater som mangler data fra 1 pasient er angitt med ÷

Δ-verdier er beregnet som placeboforsøk subtrahert fra GLP-1 forsøk

P-verdi er oppgitt for gruppevis sammenlikninger,

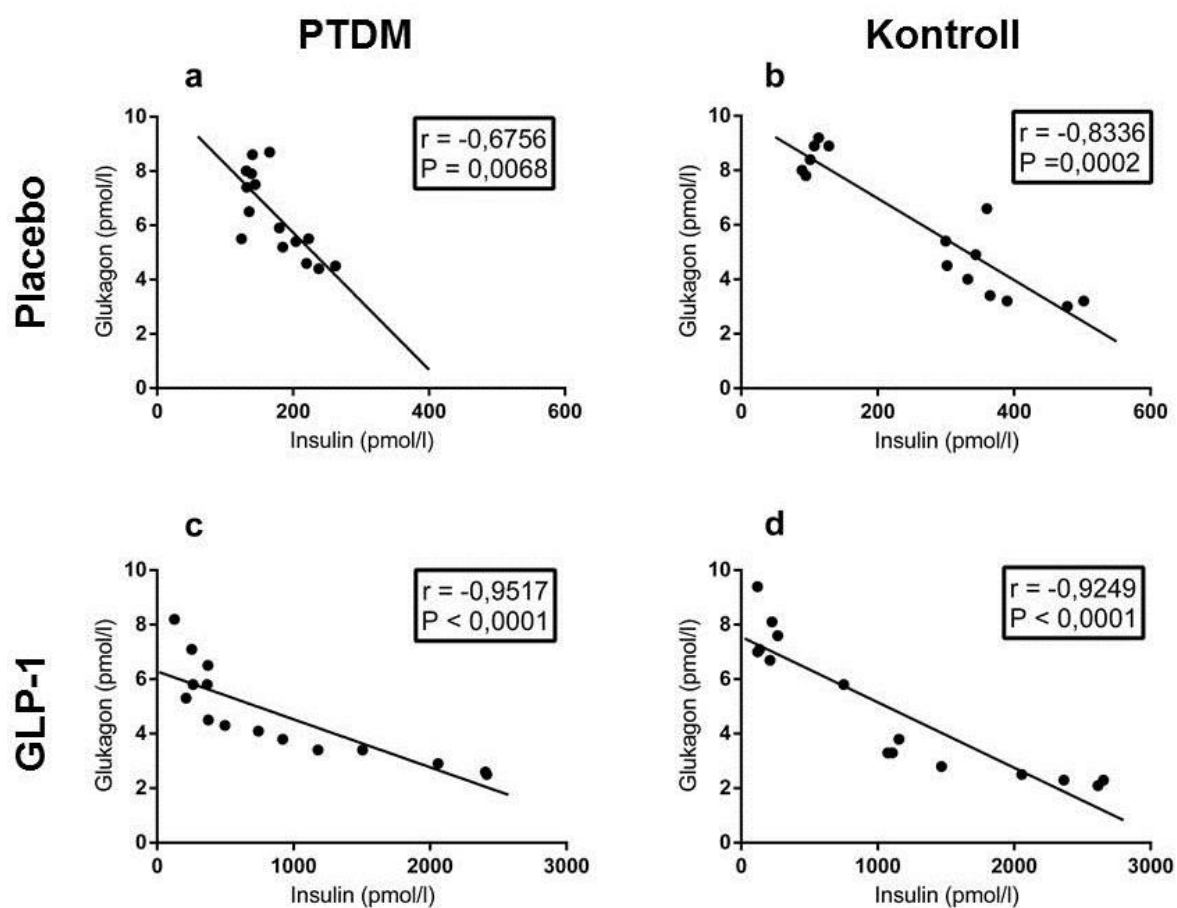
Signifikans av parede analyser innad i gruppene er angitt med: *P < 0,05, α P ≤ 0,01 #P ≤ 0,001

3.4 Insulinsensitivitet

Det var ingen signifikant forskjell i insulinsensitivitet (ISI) mellom PTDM- og kontrollgruppa, 0,062 (0,038-0,158) mot 0,069 (0,045-0,161) $\mu\text{mol/kg/min/pmol}$ ($P = 0,24$).

3.5 Interaksjon mellom insulin- og glukagonsekresjon

Sekresjon av insulin og glukagon er signifikant korrelert hos PTDM- og kontrollgruppen, både med og uten samtidig påvirkning av GLP-1 (Figur 3.2).



Figur 3.2: Korrelasjon av insulin og glukagon

for **a**; PTDM med placebo, **b**; kontroll med placebo, **c**; PTDM med GLP-1, **d**; kontroll med GLP-1

4 Diskusjon

4.1 Glukagon og insulin

Studien viser at nyretransplanterte pasienter med PTDM har signifikant redusert evne til å suppressere glukagon ved hyperglykemi. Denne effekten kommer parallelt med en redusert evne til å øke insulinsekresjon ved vedvarende hyperglykemi. Denne forskyvningen i insulin/glukagonaksen ved hyperglykemi hos PTDM-pasienter tilsvarer den som tidligere er vist hos pasienter med T2DM [60, 116], og er en viktig bidragende årsak til forhøyede postprandiale plasmaglukosekonsentrasjoner.

Fastende glukagonkonsentrasjon avviker ikke mellom nyretransplanterte pasienter med PTDM og nyretransplanterte pasienter med normal glukosetoleranse. Dette på tross av at PTDM-pasientene hadde signifikant høyere fastende plasmaglukosekonsentrasjoner og at insulinkonsentrasjonene var sammenliknbare mellom gruppene. Dette er den første studien som ser på glukagonkonsentrasjoner i PTDM-pasienter, og glukagonkonsentrasjonene som er vist ved faste samsvarer ikke med hva tidligere studier har vist i pasienter med T2DM; nemlig forhøyede fastende glukagonkonsentrasjoner [60, 61, 116]. Dette underbygger hypotesen om at PTDM er en egen type diabetes, med til dels ulik patofysiologi spesielt ved fastende plasmaglukosekonsentrasjoner, sammenliknet med T2DM. En annen mulig forklaring er at de undersøkte PTDM-pasienter var for tidlig i diabetesforløpet, da det er mulig at fastende hyperglukagonemi utvikler seg over tid.

Det er tidligere observert at pasienter med PTDM generelt karakteriseres med en mer eller mindre normal fastende plasmaglukosekonsentrasjon, men en isolert og uttalt postprandial hyperglykemi [50]. Dette i motsetning til pasienter med T2DM som har en større korrelasjon mellom fastende plasmaglukosekonsentrasjon og postprandial hyperglykemi. I og med at vi har funnet normale fastende glukagonkonsentrasjoner og redusert glukagonsuppresjon ved hyperglykemi som sammenfallende med denne observasjonen, indikerer vår studie at glukagon er faktoren som medierer dette fenomenet i PTDM-populasjonen.

Ved ESRD har pasienter som venter på nyretransplantasjon en fastende glukagonkonsentrasjon som er omtrent 3 ganger så høy som hos friske [41, 117]. Hvis man

ser på dette sammen med resultatet i denne studien, ser det ut til at det skjer en reversering av fastende glukagonkonsentrasjoner tilbake mot det normale etter nyretransplantasjon [118]. Det er ikke kjent om det er redusert eliminasjon eller hypersekresjon av glukagon som er mekanismen bak hyperglukagonemi ved ESRD. Idorn *et al.* argumenterer for en mulig GIP-stimulering av α -cellen som overkjører de fysiologiske antagonistene av glukagonsekresjon (glukose, GLP-1 og insulin) [43].

Det er som tidligere nevnt knyttet en viss usikkerhet til om PTDM i hovedsak skyldes redusert insulinsensitivitet eller insulinsekresjonskapasitet, men det ser ut som sistnevnte kan være den viktigste faktoren [57, 119, 120]. Denne studien viser at PTDM er karakterisert av svekket insulinsekresjon. Dette underbygges av at insulinsensitiviteten til PTDM-pasientene og kontrollpasientene er tilnærmet lik, mens PTDM-pasientene har en signifikant dårligere insulinsekresjon ved hyperglykemi: 1. fase insulinsekresjon er signifikant redusert, og ved vedvarende hyperglykemi ses en signifikant lavere kapasitet til å øke insulinsekresjonen (Figur 3.1a og b, Tabell 3.3). Restkapasiteten pankreas har til å skille ut insulin er også signifikant lavere etter hyperglykemisk clamp, som konfirmerer at det er dysfunksjon i PTDM-pasientenes β -celler.

I og med at fokuset i denne studien var på sekresjonsdelen, er estimering av insulinsensitivitet ikke helt optimal. I Mitrakou *et al.* sin opprinnelige metode beregnes insulinsensitiviteten i tidsrommet 120-180 minutter etter start av hyperglykemisk clamp, mens våre tilsvarende beregninger er utført i tidsrommet 90-109 minutter [109]. I tillegg til det kortere tidsrommet, er det enkelte forsøkspasienter som ikke har stabiliserte insulinkonsentrasjoner som er en forutsetning for å kunne si at infusjonshastighet av glukose er lik absorpsjonshastigheten av glukose i vev. Dermed er ikke estimeringen av insulinsensitivitet like robust som dataene på insulinsekresjonen.

GLP-1 er tidligere vist å være svært insulinotropt hos pasienter med T2DM, og en case-studie med infusjon av GLP-1 ved samtidig hyperglykemisk clamp ga den høyeste insulinkonsentrasjonen noen gang målt i en frisk person [103, 121]. Hyperglykemi ved samtidig infusjon av GLP-1 hos PTDM-pasienter gir store effekter på insulinsekresjonen; 1. fase insulinsekresjon blir mer enn 3 ganger så stor, og maksimal økning i insulinsekresjon øker med over 400 % (Figur 3.1). Dette underbygger tidligere funn som har vist at DPP4-

hemmeren sitagliptin, hvis virkningsmekanisme gir økt endogen GLP-1 konsentrasjon, gir økt insulinsekresjon hos PTDM-pasienter [75].

Infusjon med GLP-1, som gir et bilde av medikamentell behandling med GLP-1-reseptoragonist eller DPP4-hemmer, førte til en signifikant reduksjon i glukagonsekresjon ved fastende plasmaglukosekonsentrasjoner hos PTDM-pasientene, men ikke hos kontrollpasientene. Årsaken til denne forskjellen var sannsynligvis at pasientene i PTDM-gruppen hadde høyere fastende plasmaglukosekonsentrasjoner. Glukagonkonsentrasjonene sluttet å synke etter ca. 30 minutter (Figur 3.1 c). Dette indikerer at plasmaglukosekonsentrasjonene også hadde stabilisert seg ved samme tidspunkt (FPG ved tid $t = 0$ var 6,9 (6,4-7,9) mmol/L mot 4,9 (4,5-5,6) mmol/L ved tid $t = 55$ (n=5)) siden GLP-1 sin glukagonostatiske effekt kun inntreffer ved forhøyede plasmaglukosekonsentrasjoner [122]. Glukagonsuppresjon i seg selv vil hos PTDM-pasientene aldri gi hypoglykemi, uten at den kombineres med en ufysiologisk høy insulinkonsentrasjon.

4.2 Styrker og svakheter

Dette er den første studien som studerer glukagonkonsentrasjoner ved faste og hyperglykemi hos pasienter med PTDM, og det er i tillegg en av svært få studier som har undersøkt PTDM-pasienter med en hyperglykemisk clamp. En av disse studiene er fra 1992 og konkluderer med at redusert insulinsekresjon og insulinsensitivitet er likestilt i patogenesen til PTDM [123]. Disse resultatene er noe utdatert, da den største transplantasjonsspesifikke risikofaktoren for PTDM, immunsuppressiv behandling, er forbedret siden den gang. Studier publisert i nyere tid hvor patofysiologien til PTDM diskuteres, konkluderer med at det primært er insulinsekresjonen og ikke insulinsensitiviteten som er svekket ved PTDM. I disse studiene er insulinsekresjonen estimert på bakgrunn av algoritmer for insulinsekresjon etter OGTT [57, 119, 120]. Fordi vi har benyttet hyperglykemisk clamp, som er gullstandarden for å kvantifisere glukagon- og insulinkonsentrasjoner som respons på forhøyede plasmaglukosekonsentrasjoner, kan vi med større sikkerhet vise at PTDM i størst grad skyldes redusert insulinsekresjon [107, 108].

Bruk av hyperglykemisk clamp gjorde at pasientene kunne undersøkes over tid på en forhåndsdefinert plasmaglukosekonsentrasjon. Dermed kunne glukagon- og

insulinkonsentrasjoner ved hyperglykemi sammenliknes direkte mellom pasientene. En usikkerhet knyttet til undersøkelser med hyperglykemisk clamp er hvor stabilt og nært man er målkonsentrasjonen for glukose, da konsentrasjoner under målet vil underestimere insulinsekresjon og glukagonsuppresjon og *vice versa*. I studien korresponderte plasmaglukosekonsentrasjoner under clampen godt med fastende plasmaglukosekonsentrasjoner før hvert forsøk. Det ble gjort mange plasmakonsentrasjonsmålinger av glukagon fra den fastende perioden fra tid $t = 0-60$ minutter og ved hyperglykemisk periode ved tid $t = 150-169$ minutter, som gjorde at vi hadde et robust mål for baseline- og målkonsentrasjon ved beregning av glukagonsuppresjon. Den samme robustheten er i tilsvarende bestemmelse av insulinøkning.

I studier der hyperglukagonemi er dokumentert, er det variasjon i glukagonkonsentrasjoner mellom studiene, selv om alle viser at det er en signifikant relativ forskjell mellom pasientene og de friske frivillige [60, 61, 116]. Inklusjon av en kontrollgruppe i denne studien gjorde at pasientene med PTDM kunne sammenliknes med en nyretransplantert populasjon uten diabetes, og den isolerte PTDM-effekten kunne undersøkes spesifikt. Ved screening for potensielle studiedeltakere ble resultater fra OGTT 8 uker og 1 år etter transplantasjon gjennomgått. Kontrollgruppen hadde kortere tid siden transplantasjon ved inklusjon, og dermed kortere tid siden forrige OGTT som viste normal glukosetoleranse. PTDM-gruppen hadde lengre tid siden transplantasjon og OGTT, men på forsøksdagene hadde de høye FPG- og HbA1c-verdier. HbA1c er som tidligere nevnt ikke et diagnostisk kriterium, men hos pasienter med en verdi over 6,5 % er det liten sannsynlighet å være en falsk positiv indikator for PTDM [46]. Det optimale hadde vært å utføre en OGTT av hver pasient før inklusjon, men dette er en tidkrevende undersøkelse, og siden den måtte blitt gjort på en egen forsøksdag ville det også vært mer ressurskrevende for forsøkspasientene.

På grunn av svært høye insulinkonsentrasjoner i visse deler av clampen var det en del insulinprøver som måtte tines og fryses opptil 3 ganger for å finne rett fortynning til analysen. Dette var stort sett i serumprøvene til kontrollgruppen ved GLP-1 infusjon. Tining/frysing kan ha påvirket analyseresultatene, men i og med at konsentrasjonene i disse prøvene var så høye vil det mest sannsynlig ikke påvirke resultatene i studien nevneverdig.

4.3 Veien videre i prosjektet

På samme tidspunkt som insulinkonsentrasjoner ble analysert skal også proinsulin analyseres. Disse resultatene forelå ikke da denne oppgaven skulle leveres. Økte fastende proinsulinkonsentrasjoner er vist å være en signifikant markør for β -cellefunksjon og en signifikant risikofaktor for utvikling av PTDM [124]. Sekresjon av proinsulin i forhold til insulin ved test av restkapasitet vil også bli beregnet, da dette gir et bedre mål på den sekretoriske kapasitet i β -cellene [125].

Plasmarørene til analyse av glukagon var tilsatt en selektiv DPP4-hemmer, valine-pyrrolidine, slik at GLP-1 ikke skulle degraderes. Dermed kan konsentrasjoner av GLP-1 gjennom hele forsøket måles. Dette skal gjøres for å vise at eksponeringen av GLP-1 var sammenliknbar ved alle forsøksdagene.

Ut fra disse første analysene av data viser det seg at informasjon om glukosekonsentrasjoner i tidsrommet $t = 10-60$ minutter vil gi relevant tilleggsinformasjon. Frosne plasmaprøver skal analyseres med tanke på glukosekonsentrasjoner. Dette stod opprinnelig ikke i protokollen, men dette vil kunne si noe mer om effekten av GLP-1 på sekresjon av insulin og glukagon ved fastende plasmaglukosekonsentrasjoner.

5 Konklusjon

Med denne studien har vi bevist at PTDM er en bihormonell sykdom med både redusert insulinsekresjon og glukagonsuppresjon ved hyperglykemi. I motsetning til pasienter med T2DM, har nyretransplanterte pasienter med PTDM ikke forhøyede fastende glukagonkonsentrasjoner, noe som kan forklare hvorfor PTDM-pasienter ofte har isolert hyperglykemi postprandialt. I tillegg har vi beskrevet GLP-1 sin insulinotrope effekt ved hyperglykemi hos nyretransplanterte med og uten PTDM. Studien viser også at PTDM i hovedsak skyldes forstyrret sekresjon fra pankreas og ikke redusert insulinsensitivitet.

Litteraturliste

1. Foley, R.N., P.S. Parfrey, and M.J. Sarnak, *Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(12 Suppl): p. S16-23.
2. Go, A.S., et al., *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization*. N Engl J Med, 2004. **351**(13): p. 1296-305.
3. Jardine, A.G., et al., *Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants*. Lancet, 2011. **378**(9800): p. 1419-27.
4. Valderhaug, T., et al., *Reduced incidence of new-onset posttransplantation diabetes mellitus during the last decade*. Transplantation, 2007. **84**(9): p. 1125-30.
5. Eide, I.A., et al., *Limitations of hemoglobin a1c for the diagnosis of posttransplant diabetes mellitus*. Transplantation, 2015. **99**(3): p. 629-35.
6. Cosio, F.G., et al., *New onset hyperglycemia and diabetes are associated with increased cardiovascular risk after kidney transplantation*. Kidney Int, 2005. **67**(6): p. 2415-21.
7. Valderhaug, T.G., et al., *The association of early post-transplant glucose levels with long-term mortality*. Diabetologia, 2011. **54**(6): p. 1341-9.
8. Leivestad, T., *Annual report 2009*. 2010. [Cited 2015 11.03.] Available from <http://www.nephro.no/nnr.html>
9. Leivestad, T., *Annual report 2010*. 2011. [Cited 2015 11.03.] Available from <http://www.nephro.no/nnr.html>
10. Leivestad, T., *Annual report 2011*. 2012. [Cited 2015 11.03.] Available from <http://www.nephro.no/nnr.html>
11. Leivestad, T., *Annual report 2012*. 2013. [Cited 2015 11.03.] Available from <http://www.nephro.no/nnr.html>
12. Leivestad, T., *Annual report 2013*. 2014. [Cited 2015 11.03.] Available from <http://www.nephro.no/nnr.html>
13. Wolfe, R.A., et al., *Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant*. N Engl J Med, 1999. **341**(23): p. 1725-30.
14. Øyen, O., *Protokoll for nyre-, pancreas- og øycelletransplantasjon 2014-2015*. [Cited 2015 04.03] Available from <http://www.nephro.no/foreningsnytt/Tx-Protokoll-2014-15.pdf>
15. Hartmann, A., et al., *Nyremedisin - En praktisk veileder*. 3. ed. 2014, Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS.
16. Nemati, E., et al., *Does kidney transplantation with deceased or living donor affect graft survival?* Nephrourol Mon, 2014. **6**(4): p. e12182.
17. Yoo, S.W., O.J. Kwon, and C.M. Kang, *Preemptive living-donor renal transplantation: outcome and clinical advantages*. Transplant Proc, 2009. **41**(1): p. 117-20.
18. Daar, A.S., *Use of renal transplants from living donors. Practice is essential to alleviate shortage of organs*. Bmj, 1999. **318**(7197): p. 1553.
19. Halloran, P.F., *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. N Engl J Med, 2004. **351**(26): p. 2715-29.

20. Midtvedt, K., *Therapeutic drug monitoring of cyclosporine*. Transplant Proc, 2004. **36**(2 Suppl): p. 430s-433s.
21. de Jonge, H., M. Naesens, and D.R. Kuypers, *New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation*. Ther Drug Monit, 2009. **31**(4): p. 416-35.
22. Vethe, N.T., et al., *[Drug interactions and immunosuppression in organ transplant recipients]*. Tidsskr Nor Laegeforen, 2011. **131**(20): p. 2000-3.
23. Kalluri, H.V. and K.L. Hardinger, *Current state of renal transplant immunosuppression: Present and future*. World J Transplant, 2012. **2**(4): p. 51-68.
24. Shah, S.K. and G.T. Gecys, *Prednisone-induced osteoporosis: an overlooked and undertreated adverse effect*. J Am Osteopath Assoc, 2006. **106**(11): p. 653-7.
25. Heit, J.J., *Calcineurin/NFAT signaling in the beta-cell: From diabetes to new therapeutics*. Bioessays, 2007. **29**(10): p. 1011-21.
26. Yates, C.J., et al., *New-onset diabetes after kidney transplantation-changes and challenges*. Am J Transplant, 2012. **12**(4): p. 820-8.
27. Starzl, T.E., et al., *FACTORS IN SUCCESSFUL RENAL TRANSPLANTATION*. Surgery, 1964. **56**: p. 296-318.
28. van Raalte, D.H., et al., *Acute and 2-week exposure to prednisolone impair different aspects of beta-cell function in healthy men*. Eur J Endocrinol, 2010. **162**(4): p. 729-35.
29. Midtvedt, K., et al., *Insulin resistance after renal transplantation: the effect of steroid dose reduction and withdrawal*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 3233-9.
30. Pascual, J., et al., *A systematic review on steroid withdrawal between 3 and 6 months after kidney transplantation*. Transplantation, 2010. **90**(4): p. 343-9.
31. Helal, I. and L. Chan, *Steroid and calcineurin inhibitor-sparing protocols in kidney transplantation*. Transplant Proc, 2011. **43**(2): p. 472-7.
32. Woodle, E.S., et al., *A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial comparing early (7 day) corticosteroid cessation versus long-term, low-dose corticosteroid therapy*. Ann Surg, 2008. **248**(4): p. 564-77.
33. Vincenti, F., et al., *Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus*. Am J Transplant, 2007. **7**(6): p. 1506-14.
34. Ekberg, H., et al., *Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation*. N Engl J Med, 2007. **357**(25): p. 2562-75.
35. Kasiske, B.L., et al., *Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States*. Am J Transplant, 2003. **3**(2): p. 178-85.
36. Johnston, O., et al., *Sirolimus is associated with new-onset diabetes in kidney transplant recipients*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(7): p. 1411-8.
37. Aasebo, W., et al., *Impaired glucose homeostasis in renal transplant recipients receiving basiliximab*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(4): p. 1289-93.
38. Shah, T., et al., *Risk factors for development of new-onset diabetes mellitus after kidney transplantation*. Transplantation, 2006. **82**(12): p. 1673-6.
39. Haynes, R., et al., *Alemtuzumab-based induction treatment versus basiliximab-based induction treatment in kidney transplantation (the 3C Study): a randomised trial*. Lancet, 2014. **384**(9955): p. 1684-90.
40. DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of glucose intolerance in uremia*. Metabolism, 1978. **27**(12 Suppl 2): p. 1866-80.

41. Bilbrey, G.L., et al., *Hyperglucagonemia of renal failure*. J Clin Invest, 1974. **53**(3): p. 841-7.
42. American Diabetes Association., *Standards of medical care in diabetes--2013*. Diabetes Care, 2013. **36 Suppl 1**: p. S11-66.
43. Idorn, T., et al., *Gastrointestinal factors contribute to glucometabolic disturbances in nondiabetic patients with end-stage renal disease*. Kidney Int, 2013. **83**(5): p. 915-23.
44. Hecking, M., et al., *Early basal insulin therapy decreases new-onset diabetes after renal transplantation*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(4): p. 739-49.
45. Chakkerla, H.A., et al., *Hyperglycemia during the immediate period after kidney transplantation*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(4): p. 853-9.
46. Sharif, A., et al., *Proceedings from an international consensus meeting on posttransplantation diabetes mellitus: recommendations and future directions*. American journal of transplantation, 2014. **14**(9): p. 1992-2000.
47. Davidson, J., et al., *New-onset diabetes after transplantation: 2003 International consensus guidelines. Proceedings of an international expert panel meeting. Barcelona, Spain, 19 February 2003*. Transplantation, 2003. **75**(10 Suppl): p. Ss3-24.
48. WHO, *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia*. 2006. [Cited 2015 03.02] Available from http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/
49. Sharif, A., R.H. Moore, and K. Baboolal, *The use of oral glucose tolerance tests to risk stratify for new-onset diabetes after transplantation: An underdiagnosed phenomenon*. Transplantation, 2006. **82**(12): p. 1667-72.
50. Valderhaug, T.G., et al., *Fasting plasma glucose and glycosylated hemoglobin in the screening for diabetes mellitus after renal transplantation*. Transplantation, 2009. **88**(3): p. 429-34.
51. Armstrong, K.A., et al., *Should an oral glucose tolerance test be performed routinely in all renal transplant recipients?* Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(1): p. 100-8.
52. Hare, M.J., J.E. Shaw, and P.Z. Zimmet, *Current controversies in the use of haemoglobin A1c*. J Intern Med, 2012. **271**(3): p. 227-36.
53. Kesiraju, S., et al., *New onset of diabetes after transplantation - an overview of epidemiology, mechanism of development and diagnosis*. Transpl Immunol, 2014. **30**(1): p. 52-8.
54. Cosio, F.G., et al., *Post-transplant diabetes mellitus: increasing incidence in renal allograft recipients transplanted in recent years*. Kidney Int, 2001. **59**(2): p. 732-7.
55. U.S.Renal Data System., *USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*. 2013. [Cited 2015 03.05] Available from http://www.usrds.org/2013/pdf/v2_ch7_13.pdf:
56. Hjelmessaeth, J., et al., *Glucose intolerance after renal transplantation depends upon prednisolone dose and recipient age*. Transplantation, 1997. **64**(7): p. 979-83.
57. Hecking, M., et al., *Glucose metabolism after renal transplantation*. Diabetes Care, 2013. **36**(9): p. 2763-71.
58. Midtvedt, K., et al., *Insulin resistance is a common denominator of post-transplant diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in renal transplant recipients*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(2): p. 427-31.

59. Unger, R.H. and L. Orci, *The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus*. Lancet, 1975. **1**(7897): p. 14-6.
60. Knop, F.K., et al., *Inappropriate suppression of glucagon during OGTT but not during isoglycaemic i.v. glucose infusion contributes to the reduced incretin effect in type 2 diabetes mellitus*. Diabetologia, 2007. **50**(4): p. 797-805.
61. Henkel, E., et al., *Impact of glucagon response on postprandial hyperglycemia in men with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus*. Metabolism, 2005. **54**(9): p. 1168-73.
62. Bagger, J.I., et al., *Glucagon responses to increasing oral loads of glucose and corresponding isoglycaemic intravenous glucose infusions in patients with type 2 diabetes and healthy individuals*. Diabetologia, 2014. **57**(8): p. 1720-5.
63. Moon, J.S. and K.C. Won, *Pancreatic alpha-Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes: Old Kids on the Block*. Diabetes Metab J, 2015. **39**(1): p. 1-9.
64. Lund, A., et al., *Glucagon and type 2 diabetes: the return of the alpha cell*. Curr Diab Rep, 2014. **14**(12): p. 555.
65. Montori, V.M., et al., *Posttransplantation diabetes: a systematic review of the literature*. Diabetes Care, 2002. **25**(3): p. 583-92.
66. Einollahi, B., et al., *The impact of cytomegalovirus infection on new-onset diabetes mellitus after kidney transplantation: a review on current findings*. J Nephropathol, 2014. **3**(4): p. 139-48.
67. Pham, P.T., et al., *New onset diabetes after transplantation (NODAT): an overview*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2011. **4**: p. 175-86.
68. Ruderman, I., et al., *New onset diabetes after kidney transplantation in autosomal dominant polycystic kidney disease: a retrospective cohort study*. Nephrology (Carlton), 2012. **17**(1): p. 89-96.
69. Sharif, A., R. Moore, and K. Baboolal, *Influence of lifestyle modification in renal transplant recipients with postprandial hyperglycemia*. Transplantation, 2008. **85**(3): p. 353-8.
70. Zoungas, S., et al., *Severe hypoglycemia and risks of vascular events and death*. N Engl J Med, 2010. **363**(15): p. 1410-8.
71. Drucker, D.J. and M.A. Nauck, *The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes*. Lancet, 2006. **368**(9548): p. 1696-705.
72. Therasse, A., A. Wallia, and M.E. Molitch, *Management of post-transplant diabetes*. Curr Diab Rep, 2013. **13**(1): p. 121-9.
73. Friedrich, C., et al., *Renal impairment has no clinically relevant effect on the long-term exposure of linagliptin in patients with type 2 diabetes*. Am J Ther, 2013. **20**(6): p. 618-21.
74. Werzowa, J., et al., *Antidiabetic therapy in post kidney transplantation diabetes mellitus*. Transplant Rev (Orlando), 2015.
75. Strom Halden, T.A., et al., *Short-term efficacy and safety of sitagliptin treatment in long-term stable renal recipients with new-onset diabetes after transplantation*. Nephrol Dial Transplant, 2014. **29**(4): p. 926-33.
76. Simpson, S.H., et al., *Mortality risk among sulfonylureas: a systematic review and network meta-analysis*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. **3**(1): p. 43-51.
77. Kahn, S.E., et al., *Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy*. N Engl J Med, 2006. **355**(23): p. 2427-43.
78. Cherrington, A. and M. Vranic, *Role of glucagon and insulin in control of glucose turnover*. Metabolism, 1971. **20**(6): p. 625-8.

79. Orci, L., *The morphology of proinsulin processing*. Ann N Y Acad Sci, 1986. **488**: p. 292-316.
80. Goodman LS, G.A., Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC, *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 12 ed. 2011, New York: McGraw-Hill Medical.
81. Menge, B.A., et al., *Loss of inverse relationship between pulsatile insulin and glucagon secretion in patients with type 2 diabetes*. Diabetes, 2011. **60**(8): p. 2160-8.
82. Ward, W.K., et al., *Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1984. **74**(4): p. 1318-28.
83. Palmer, J.P., et al., *C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001*. Diabetes, 2004. **53**(1): p. 250-64.
84. Campbell, J.E. and D.J. Drucker, *Islet alpha cells and glucagon-critical regulators of energy homeostasis*. Nat Rev Endocrinol, 2015.
85. Gromada, J., I. Franklin, and C.B. Wollheim, *Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains*. Endocr Rev, 2007. **28**(1): p. 84-116.
86. Bataille, D. and S. Dalle, *The forgotten members of the glucagon family*. Diabetes Res Clin Pract, 2014. **106**(1): p. 1-10.
87. Charron, M.J. and P.M. Vuguin, *Lack of glucagon receptor signaling and its implications beyond glucose homeostasis*. J Endocrinol, 2015. **224**(3): p. R123-30.
88. Taylor, S.I., *Deconstructing type 2 diabetes*. Cell, 1999. **97**(1): p. 9-12.
89. Unger, R.H. and A.D. Cherrington, *Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 4-12.
90. Unger, R.H. and L. Orci, *Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology (first two parts)*. N Engl J Med, 1981. **304**(25): p. 1518-24.
91. Nauck, M.A., et al., *Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses*. J Clin Endocrinol Metab, 1986. **63**(2): p. 492-8.
92. Kase, E.T. and K.I. Birkeland, *[Antidiabetics which affect the incretin system]*. Tidsskr Nor Laegeforen, 2008. **128**(4): p. 440-2.
93. Eissele, R., et al., *Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man*. Eur J Clin Invest, 1992. **22**(4): p. 283-91.
94. Mortensen, K., et al., *GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine*. Regul Pept, 2003. **114**(2-3): p. 189-96.
95. Orskov, C., A. Wettergren, and J.J. Holst, *Secretion of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide correlates with insulin secretion in normal man throughout the day*. Scand J Gastroenterol, 1996. **31**(7): p. 665-70.
96. Borgstrom, B., et al., *Studies of intestinal digestion and absorption in the human*. J Clin Invest, 1957. **36**(10): p. 1521-36.
97. Roberge, J.N. and P.L. Brubaker, *Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop*. Endocrinology, 1993. **133**(1): p. 233-40.
98. Fieseler, P., et al., *Physiological augmentation of amino acid-induced insulin secretion by GIP and GLP-I but not by CCK-8*. Am J Physiol, 1995. **268**(5 Pt 1): p. E949-55.

99. Rocca, A.S. and P.L. Brubaker, *Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion*. *Endocrinology*, 1999. **140**(4): p. 1687-94.
100. Deacon, C.F. and B. Ahren, *Physiology of incretins in health and disease*. *Rev Diabet Stud*, 2011. **8**(3): p. 293-306.
101. Vilsboll, T., et al., *Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(1): p. 220-4.
102. Vilsboll, T. and J.J. Holst, *Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2004. **47**(3): p. 357-66.
103. Knop, F.K., et al., *Unprecedented high insulin secretion in a healthy human subject after intravenous glucagon-like peptide-1: a case report*. *BMC Res Notes*, 2014. **7**: p. 326.
104. Fehmann, H.C., R. Goke, and B. Goke, *Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide*. *Endocr Rev*, 1995. **16**(3): p. 390-410.
105. Meier, J.J., et al., *Normalization of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(6): p. 2719-25.
106. Carr, R.D., et al., *Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy men*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(4): p. E779-84.
107. Elahi, D., *In praise of the hyperglycemic clamp. A method for assessment of beta-cell sensitivity and insulin resistance*. *Diabetes Care*, 1996. **19**(3): p. 278-86.
108. DeFronzo, R.A., J.D. Tobin, and R. Andres, *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. *Am J Physiol*, 1979. **237**(3): p. E214-23.
109. Mitrakou, A., et al., *Simultaneous assessment of insulin secretion and insulin sensitivity using a hyperglycemia clamp*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992. **75**(2): p. 379-82.
110. van Haeften, T.W., et al., *Disturbances in beta-cell function in impaired fasting glycemia*. *Diabetes*, 2002. **51 Suppl 1**: p. S265-70.
111. Ward, W.K., et al., *Adaptation of B and A cell function during prolonged glucose infusion in human subjects*. *Am J Physiol*, 1984. **246**(5 Pt 1): p. E405-11.
112. Rickels, M.R., et al., *Effect of glucagon-like peptide-1 on beta- and alpha-cell function in isolated islet and whole pancreas transplant recipients*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(1): p. 181-9.
113. McGuire, E.A., et al., *Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man*. *J Appl Physiol*, 1976. **41**(4): p. 565-73.
114. Orskov, C., et al., *Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(2): p. 415-23.
115. Lamb, E.J., C.R. Tomson, and P.J. Roderick, *Estimating kidney function in adults using formulae*. *Ann Clin Biochem*, 2005. **42**(Pt 5): p. 321-45.
116. Muller, W.A., et al., *Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion*. *N Engl J Med*, 1970. **283**(3): p. 109-15.
117. Idorn, T., et al., *Postprandial responses of incretin and pancreatic hormones in non-diabetic patients with end-stage renal disease*. *Nephrol Dial Transplant*, 2014. **29**(1): p. 119-27.

118. Billbrey, G.L., et al., *Hyperglucagonemia in uremia: reversal by renal transplantation*. Ann Intern Med, 1975. **82**(4): p. 525-8.
119. Nam, J.H., et al., *beta-Cell dysfunction rather than insulin resistance is the main contributing factor for the development of postrenal transplantation diabetes mellitus*. Transplantation, 2001. **71**(10): p. 1417-23.
120. Hagen, M., et al., *A 6-year prospective study on new onset diabetes mellitus, insulin release and insulin sensitivity in renal transplant recipients*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(10): p. 2154-9.
121. Ahren, B., H. Larsson, and J.J. Holst, *Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 473-8.
122. Nauck, M.A., *Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in the treatment of diabetes*. Horm Metab Res, 2004. **36**(11-12): p. 852-8.
123. Ekstrand, A.V., et al., *Insulin resistance and insulin deficiency in the pathogenesis of posttransplantation diabetes in man*. Transplantation, 1992. **53**(3): p. 563-9.
124. Zelle, D.M., et al., *Pancreatic beta-cell dysfunction and risk of new-onset diabetes after kidney transplantation*. Diabetes Care, 2013. **36**(7): p. 1926-32.
125. Roder, M.E., et al., *Disproportionately elevated proinsulin levels reflect the degree of impaired B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(2): p. 604-8.

Appendiks A: Studien

AI: Studieprotokoll

Version no.-3 - 1.4.2014

Hyperglucagonemia in renal transplant recipients with post transplantation diabetes mellitus

Glucagon study-14

Sponsor:	Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway.
Principal investigator/ Chairman of the Clinical Steering Committee:	<i>Trond Jenssen, MD, PhD. Professor of Medicine</i> Department of Organ Transplantation, Division of Cancer, Surgery and Transplantation, Section of Nephrology, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway Department of Clinical Medicine, University of Tromsø, Norway
Clinical Steering committee The study is carried out under the supervision of the following persons:	<i>Trond Jenssen, MD, PhD. Professor of Medicine.</i> Department of Organ Transplantation, Division of Cancer, Surgery and Transplantation, Section of Nephrology, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway Department of Clinical Medicine, University of Tromsø, Norway <i>Thea Anine S. Halden. Master in Pharm., PhD candidate</i> Department of Organ Transplantation, Division of Cancer, Surgery and Transplantation, Section of Nephrology, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway <i>Erlend Egeland, Master grade student (Pharm.)</i> Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo, Norway <i>Anders Åsberg, PhD. Professor</i> Head of Laboratory of Renal Research, Department of Organ Transplantation, Division of Cancer, Surgery and Transplantation, Section of Nephrology, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo, Norway <i>Anders Hartmann, MD, PhD. Professor of Nephrology</i> Department of Organ Transplantation, Division of Cancer, Surgery and Transplantation, Section of Nephrology, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway

Bo Feldt-Rasmussen, Professor, DMSc

Head of Clinic, Department of Nephrology, Rigshospitalet,
University of Copenhagen, Denmark

Mads Hornum, MD, PhD

Department of Nephrology, Rigshospitalet, University of
Copenhagen, Denmark

Filip K. Knop, MD, PhD. Associate Professor

Head of Diabetes Research Division, Department of
Medicine, Gentofte Hospital, University of Copenhagen,
Denmark

Jens Juul Holst, MD, Professor of Medical Physiology

Department of Biomedical Sciences at the faculty of Health
Sciences, University of Copenhagen, Denmark

Kirsten Lund, Biomedical Laboratory Scientist

Department of Organ Transplantation, Division of Cancer,
Surgery and Transplantation, Section of Nephrology, Oslo
University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway

Hassan Zaré Khiabani

Section leader, Department of Pharmacology, Oslo
University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway

Background

About 300 renal transplantations are performed at Oslo University Hospital Rikshospitalet each year, allowing well-controlled studies to be performed within a reasonable time frame. At present the main focus is to further improve long-term outcomes in these patients by reducing their increased cardiovascular risk which at least partly is due to the mandatory immunosuppressive therapy and other concomitant medication.

Post transplantation diabetes mellitus (PTDM) develops in 10-15 % of all renal transplant recipients within 10 weeks after transplantation [1], and has been associated with increased risk of cardiovascular disease and impaired patient survival [2-4]. PTDM is primarily believed to be a variant of type 2 diabetes mellitus (T2DM), with the addition of certain risk factors such as immunosuppressive therapy and viral infections (e.g. cytomegalovirus). T2DM has over the years been considered a disease caused by an imbalance in the insulin release/insulin sensitivity axis. However, already in the 1980s it was documented that T2DM actually is a bihormonal disease, characterized not only by insulin resistance and β -cell failure, but also increased α -cell function and hyperglucagonemia [5]. Hyperglucagonemia is present both in the fasting state and after meals. Since glucagon stimulates breakdown of glycogen and gluconeogenesis in the liver and thereby increases hepatic glucose output, the net result is fasting and postprandial hyperglycemia [6]. This hyperglucagonemia is recently also demonstrated in uremic patients with impaired glucose tolerance [7], but unfortunately, we do not have information on glucagon release and post-challenge glucagon profiling in patients with PTDM.

Rationale

The incretin hormones glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) are insulinotropic peptide hormones secreted from enteroendocrine mucosal cells in response to food intake. They are responsible for up to 70 % of the insulin response following ingestion of glucose (the incretin effect) in healthy individuals [8]. Notably, GLP-1 also exerts glucagonostatic properties and contribute to the suppressed plasma concentrations of glucagon during oral glucose administration [9]. Patients with T2DM have impairments in the incretin system and furthermore they exhibit severely elevated plasma glucagon levels that are non-suppressible after glucose administration [10,

11]. PTDM is primarily believed to be a variant of T2DM, but the pathophysiology underlying the impaired glucose metabolism in renal transplant recipients with PTDM is unclear and some aspects have been poorly investigated. Hyperglycemic clamp investigations with concomitant infusions of GLP-1 and GIP, respectively, are warranted for a thorough characterization of the α -cell and β -cell function. Also, it remains to be elucidated whether hyperglucagonemia is an important mechanism underlying the hyperglycemia in PTDM.

Ethical considerations

Renal transplant recipients die prematurely due to cardiovascular disease, and development of PTDM contributes to their increased cardiovascular risk. It is therefore important to further elucidate the pathophysiology of PTDM in order to expose potential treatment targets that may be utilized to prevent the development of cardiovascular disease in these patients. In this study we primarily intend to investigate glucagon release and post-challenge glucagon profiling in renal transplant recipients with PTDM. Such knowledge may be helpful in finding better antidiabetic treatment options providing cardiovascular risk reductions and improvements in quality of life and life span in patients with PTDM.

There are no major ethical considerations with this study. The hyperglycemic clamp investigation is well-known and has been used in several previous studies on transplanted patients without problems. We will only obtain serial blood samples from an intravenous catheter (venflon), which is a safe procedure used in general clinical practice. During the clamp investigation we collect less than 2 dl of blood, which is considered not to be of clinical significance in these patients.

Study objectives

The primary objective of the present study is to assess whether hyperglucagonemia is present in renal transplant recipients with PTDM. Furthermore, we aim to examine the insulinotropic and glucagon suppressive effects of GLP-1 (compared to placebo) in PTDM patients during fasting glycemia and during hyperglycemic conditions (hyperglycemic clamp), respectively.

Secondary objectives are to investigate:

- The functional reserve capacity in glucagon and insulin release (measurement of functional α -cell and β -cell mass) by a glucose-potentiated arginine test; since arginine is a glucose-independent stimulator of the release of both hormones.
- The effect of GLP-1 on proinsulin secretory ratio (PISR), since differences in β -cell secretory capacity has been associated with inappropriate proinsulin secretion.
- The estimated insulin sensitivity index (ISI) by recording the glucose infusion rate during the hyperglycemic clamp, corrected for the prevailing plasma insulin concentrations.

Study design

Twelve eligible renal transplant recipients with PTDM and twelve age, gender, BMI and renal function-matched non-diabetic renal transplant recipients (control group) will undergo a hyperglycemic clamp [fasting plasma glucose (fPG) + 5 mmol/L] with concomitant GLP-1 or placebo infusions on alternate randomized occasions. On each occasion, performed 2-4 weeks apart, 5 g arginine will be injected over a 1-min period in the end of the hyperglycemic clamp condition, as shown in Figure 1.

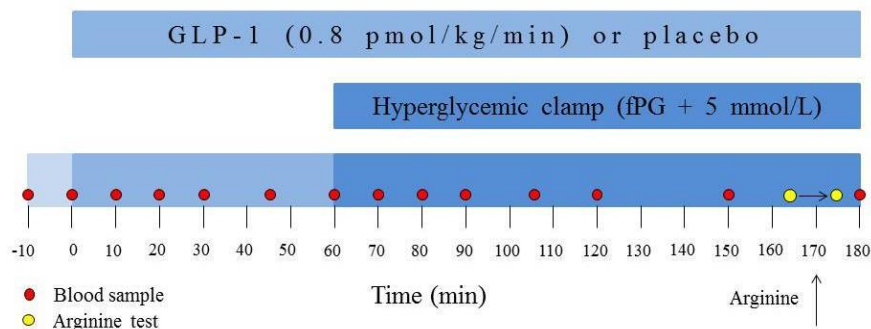


Figure 1: Study design, fPG; fasting plasma glucose, blood sample; glucagon, GLP-1 (chilled EDTA tubes), insulin, C-peptide, proinsulin (heparin tubes) and glucose.

All patients will be instructed to maintain their usual exercise and diet habits during the study. Any antidiabetic agents, including insulin, will be washed out for 7 days before each experimental day. On each experimental day, the patients will be studied in the recumbent position after an overnight (10 h) fast including liquids and tobacco. For blood sampling, a catheter will be placed in a cubital vein in an arm wrapped in a heat pad for collection of arterialized blood [12]. Baseline blood samples of glucagon, GLP-1, glucose, insulin, C-peptide and proinsulin will be drawn at $t = -10$ min, and thereafter repeatedly to 180 min, as shown in Figure 1.

Patients

The renal transplant recipients will primarily be recruited from the great-Oslo area. All potential participants will be approached by a letter outlining the nature of the study. The letter will emphasize that denial of participation in the study will not have consequences for further treatment of the patient. The patients will follow standard follow-up procedures and this protocol will not determine any intervention of the patients. All study visits will be performed at Oslo University Hospital (OUS), Rikshospitalet. Informed consent will be obtained according to the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice (GCP). Patients are to give their informed consent before any study specific investigations and the signed form (by both the patient and investigator) will be kept on file. The patient will receive a copy of the signed patient information. The patient data will be recorded in Case Report Forms (CRF) and all information will be handled confidentially. Any complications will be recorded.

Inclusion criteria:

- Renal transplant recipients more than 1 year post transplant with stable renal function (less than 20% deviation in serum creatinine within the last 2 months) and stable prednisolone dose (maximum 5 mg/day) the last three months before inclusion
 - Diagnose of PTDM on standard clinical follow-up performed 8 weeks and 1 year post transplant at OUS-Rikshospitalet (fasting plasma glucose ≥ 7.0 mmol/l and/or 2-hour plasma glucose ≥ 11.1 mmol/l following an oral glucose tolerance test)
- OR
- Non-diabetic renal transplant recipients with a normal glucose tolerance test (control group)

- > 18 years of age
- BMI 18.5–29.9 kg/m²
- Signed informed consent

Exclusion criteria:

- Severe liver disease
- Pancreatitis (chronic or acute), previous bowel resection, inflammatory bowel disease, malignancy (previous or actual)
- Estimated GFR < 25 ml/min/1.73 m²
- Pregnant or nursing mothers

Study procedures

The study procedures will be performed at two occasions, 2–4 weeks apart, for each patient.

Blood samples

A catheter will be placed in a cubital vein in an arm wrapped in a heat pad for collection of arterialized blood [12]. Baseline blood samples of glucagon, GLP-1, glucose, insulin, C-peptide and proinsulin will be drawn at $t = -10$ min, and thereafter at 0, 10, 20, 30, 45, 60, 70, 80, 90, 105, 120, 150 and 180 min (Figure 1). Blood will be sampled into chilled 10 ml tubes containing EDTA plus a specific dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor (valine-pyrrolidide, final concentration 0.01 mmol/l) for analyses of glucagon and GLP-1 and 4 ml Heparin tubes for analyses of insulin, C-peptide and proinsulin. The EDTA tubes will be kept on ice before and after blood sampling and centrifuged for 20 min at 1200 x g and 4 °C, before plasma will be separated and stored at -70°C until analysis.

GLP-1 administration

Lyophilized GLP-1 (7–36) amide will be reconstituted according to the supplier's instructions the evening before the study. The GLP-1 infusion will consist of 10 µg/ml GLP-1 (7–36) amide (weight-dependent), 10 ml of 5 % human albumin, filled with isotonic saline (9 g/l) to a total of 40 ml. On the study day, a catheter will be inserted in the contralateral cubital vein for GLP-1/placebo infusions. At $t = 0$ min, a continuous GLP-1 or matching placebo infusion will be initiated in a randomized fashion. GLP-1 will be infused at a rate of 0.8 pmol/kg/min,

until the completion of blood sampling at $t = 180$ min [13]. This rate of administration is expected to mimic physiological postprandial plasma concentrations of GLP-1.

Glucose-potentiated arginine test

A hyperglycemic clamp will be started at $t = 60$ min, starting with a body-weight adapted intravenous bolus of 50 % glucose to increase plasma glucose to fasting plasma glucose (fPG) + 5 mmol/l. Plasma glucose will be kept at fPG + 5 mmol/l by continuous infusion of 20 % glucose adjusted according to bedside plasma glucose measured every 5 min [14]. At $t = 170$ min, i.e. during hyperglycemia, 5 g arginine will be injected over a 1-min period [15]. Pre-stimulus blood samples will be taken at -5 min ($t = 165$) and -1 min ($t = 169$) before the injection, and additional blood samples will be collected 2, 3, 4 and 5 min after injection (at $t = 172$ -175 min).

Blood pressure

Blood pressure will be measured seated after ten minutes rest by Dyna Map (Tuff.-Cuff, CAS Medical system Inc.) and the mean of the lower two out of three measurements will be used.

Calcineurin blood concentrations

Whole-blood and plasma samples (3 ml EDTA tubes) for determination of whole-blood cyclosporine (CsA, C0) or tacrolimus (Tac, C0) and mycophenolate concentration will be drawn according to standard procedures.

Clinical information

Demographic data of the included patients will be registered in CRFs; age, height, weight, renal function (GFR), time of transplantation and concomitant drugs.

Laboratory methods

Blood samples for measurement of glucose concentrations every 5 min will be measured bedside with a portable plasma calibrated glucose analyzer (Hemocue® Glucose 201, Ängelholm, Sverige). C-peptide, insulin, proinsulin as well as standard hematological blood samples will be analyzed at the Hospital central laboratory. Glucagon and GLP-1 will be

analyzed by Professor Jens Juul Holst at Department of Biomedical Sciences at the faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Denmark.

Withdrawals

Patients are free to express the wish to withdraw at any time in accordance with GCP.

Information to study personnel

All involved study personnel will receive the full study protocol and they will in addition be informed on a start-up meeting about the study procedures. Any changes during the study will be forwarded to the Regional Ethics Committee and distributed by the Principal Investigator via e-mail to all involved study personnel.

Calculations

Insulin sensitivity will be assessed as an insulin sensitivity index (ISI; M/I) [16] and calculated by dividing the mean glucose infusion rate during the last hour of each clamp by the mean plasma insulin concentration during the same interval [17].

In the glucose-dependent arginine stimulation test, the acute insulin, glucagon and proinsulin secretory response to arginine will be calculated as the mean of the plasma insulin (AIR), glucagon (AGR) and proinsulin (APR) concentrations at 2-5 min after the arginine injection minus the pre-stimulus concentration [18].

The proinsulin secretory ratio (PISR) under the hyperglycemic condition will be examined from the acute proinsulin-to-insulin (PI/I) ratio response to arginine [19]. The PI/I ratio will be calculated as the molar concentration of proinsulin divided by the molar concentration of insulin x 100.

Statistical considerations

Number of patients

According to the literature, we assume that the PTDM group will have $30 \pm 15\%$ higher baseline plasma glucagon concentrations than the control group, and a corresponding difference during GLP-1 induced suppression of glucagon. Twenty patients are needed to

assure a power of 90% to show a difference at a 5% significance level. We will include 24 patients (12 patients in each group) to allow for 20% drop-out from the study.

Analysis plan

Comparisons of responses with GLP-1 versus placebo infusions within each group will be performed using the Wilcoxon matched pairs test, and comparisons between the groups will be performed using the unpaired Student's *t*-test (for normally distributed data) or Mann-Whitney *U*-test. Correlations will be performed by least squares linear regression.

Demographical data will be summarized using means, medians, minimums, maximums and standard deviations for normally distributed variables and frequency counts and percent for categorical variables.

Study duration

Estimated date of first patient enrolled: 01.06.2014

Anticipated recruitment period: 12 months

Estimated date of last patient completed: 01.06.2015

Biobank

Blood samples taken will be stored in a biobank at Oslo University Hospital, Rikshospitalet. Oslo University Hospital Rikshospitalet by the Research Director Erlend B. Smeland is responsible for the biobank. The biological material may be used only with the approval of the Regional Committee for Medical Research Ethics (REK).

Documents file

Study documentation will be stored for at least 15 years after study completion, in accordance with current guidelines.

Subject confidentiality

The subject has a right for a protection against invasion of privacy. In this study, each subject will receive a unique identification number, which will be linked to the CRF. The data will then be blinded (O: "avidentifisert") correspondingly in all analyses.

However, the study monitor, representatives from any Regulatory Authority, as well as the appropriate Ethical Committee are permitted to review the subject's primary medical records including laboratory test result reports, admission and discharge summaries during the study.

Publication policy

All personnel who have contributed significantly with the planning and performance of the study (Vancouver convention 1988) may be included in the list of authors.

International guidelines for authorship will be adhered to persons designed as authors and has qualified for authorship by participating sufficiently in the work to take public responsibility for the content. It emphasized however that only those who entirely meet with these criteria will be listed as authors. The findings of this study will in due course and by mutual agreement be published in a scientific journal.

Financing

The study has received funding from South-Eastern Norway Regional Health Authority (project number 2013047).

Insurance

The patients are insured according to Act of Product Responsibility.

Approvals

The study will be performed according to GCP, ICH guidelines and the Declaration of Helsinki. The study has been evaluated by the Regional Committee for Medical Research ethics, Health region south and The Data Inspectorate prior to study start.

References

1. Valderhaug TG, Hjelmesaeth J, Rollag H, Leivestad T, Roislien J, Jenssen T *et al.* Reduced incidence of new-onset posttransplantation diabetes mellitus during the last decade. *Transplantation* 2007; 84: 1125-30.
2. Hjelmesaeth J, Hartmann A, Leivestad T, Holdaas H, Sagedal S, Olstad M *et al.* The impact of early-diagnosed new-onset post-transplantation diabetes mellitus on survival and major cardiac events. *Kidney Int* 2006; 69: 588-95.
3. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D and Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2003; 3: 178-85.
4. Valderhaug TG, Hjelmesaeth J, Hartmann A, Roislien J, Bergrem HA, Leivestad T *et al.* The association of early post-transplant glucose levels with long-term mortality. *Diabetologia* 2011; 54: 1341-9.
5. Unger RH and Orci L. The role of glucagon in diabetes. *Compr Ther* 1982; 8: 53-9.
6. Unger RH and Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest* 2012; 122: 4-12.
7. Idorn T, Knop FK, Jorgensen M, Holst JJ, Hornum M and Feldt-Rasmussen B. Postprandial responses of incretin and pancreatic hormones in non-diabetic patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2013.
8. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R *et al.* Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 492-8.
9. Vilsboll T and Holst JJ. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2004; 47: 357-66.
10. Henkel E, Menschikowski M, Koehler C, Leonhardt W and Hanefeld M. Impact of glucagon response on postprandial hyperglycemia in men with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2005; 54: 1168-73.
11. Shah P, Basu A, Basu R and Rizza R. Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans. *Am J Physiol* 1999; 277: E283-90.

12. McGuire EA, Helderman JH, Tobin JD, Andres R and Berman M. Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man. *J Appl Physiol* 1976; 41: 565-73.
13. Meier JJ, Gallwitz B, Salmen S, Goetze O, Holst JJ, Schmidt WE *et al.* Normalization of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2719-25.
14. Hansen KB, Vilsboll T, Bagger JI, Holst JJ and Knop FK. Impaired incretin-induced amplification of insulin secretion after glucose homeostatic dysregulation in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 1363-70.
15. Rickels MR, Mueller R, Markmann JF and Naji A. Effect of glucagon-like peptide-1 on beta- and alpha-cell function in isolated islet and whole pancreas transplant recipients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 181-9.
16. DeFronzo RA, Tobin JD and Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: E214-23.
17. Mitrakou A, Vuorinen-Markkola H, Raptis G, Toft I, Mokan M, Strumph P *et al.* Simultaneous assessment of insulin secretion and insulin sensitivity using a hyperglycemia clamp. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 379-82.
18. Ward WK, Halter JB, Beard JC and Porte D, Jr. Adaptation of B and A cell function during prolonged glucose infusion in human subjects. *Am J Physiol* 1984; 246: E405-11.
19. Guldstrand M, Ahren B and Adamson U. Improved beta-cell function after standardized weight reduction in severely obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E557-65.

AII: Søknad til Regional Etisk Komité (REK)

Prosjektsøknad Skjema for søknad om godkjenning av forskningsprosjekt i de regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK)

2014/666-1

Dokument-id: 470520 Dokument mottatt 08.04.2014

Glukagon ved diabetes etter nyretransplantasjon

1. Generelle opplysninger

a. Prosjekttittel	
Glukagon ved diabetes etter nyretransplantasjon	
Hyperglucagonemia in renal transplant recipients with post transplantation diabetes mellitus; the insulinotropic and glucagon suppressive effects of GLP-1	

b. Prosjektleder	
Navn:	Trond Jenssen
Akademisk grad:	Professor
Klinisk kompetanse:	Indremedisin
Stilling:	Overlege
Hovedarbeidssted:	Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet
Arbeidsadresse:	Gaustadjordet
Postnummer:	0027
Sted:	Oslo
Telefon:	23073646
E-post adresse:	trond.jenssen@oslo-universitetssykehus.no

c. Forskningsansvarlig	
1. Forskningsansvarlig	
Institusjon:	OUS Rikshospitalet
Kontaktperson:	Erlend B. Smeland
Stilling:	Forskningsdirektør
Telefon:	22500730
Mobiltelefon:	91388199
E-post adresse:	e.b.smedland@medisin.uio.no

d. Andre projektopplysninger

Initiativtaker til projektet er prosjektleder eller forskningsansvarlig (bidragsforskning)

Selvstendig datainnsamling i utlandet

1. Biomedicinsk Institut, Universitetet i København, Danmark

Utdanningsprosjekt/doktorgradsprosjekt Doktorgrad, Cand.scient

Relatert forskningsprosjekt

Endotelfunksjon etter pankreastransplantasjon

Forskningsprosjektet er behandlet i REK etter 5. mai 2009

REK sør-øst C Mappennummer 2013/1062

e. Prosjektmedarbeidere

1. Prosjektmedarbeider

Navn: Trond Jenssen

Stilling: Overlege

Institusjon: Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet

Akademisk rolle: MD, PhD. Professor i medisin

Prosjektrolle: Prosjektleder

2. Prosjektmedarbeider

Navn: Thea Anine Strøm Halden

Stilling: Stipendiat

Institusjon: Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet

Akademisk rolle: Cand.Pharm/Master i farmasi

Prosjektrolle: Prosjektmedarbeider

3. Prosjektmedarbeider

Navn: Erlend Egeland

Stilling: Student

Institusjon: Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet

Akademisk rolle: Master i farmasi (student)

Prosjektrolle: Prosjektmedarbeider

4. Prosjektmedarbeider

Navn: Anders Åsberg

Stilling: Cand.Scient. Sjef for Nyrefysiologisk laboratorium

Institusjon: Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet
Akademisk rolle: PhD. Professor
Prosjektrolle: Prosjektmedarbeider

5. Prosjektmedarbeider

Navn: Anders Hartmann
Stilling: Overlege
Institusjon: Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet
Akademisk rolle: MD, PhD. Professor i nefrologi
Prosjektrolle: Prosjektmedarbeider

6. Prosjektmedarbeider

Navn: Bo Feldt-Rasmussen
Stilling: Overlege
Institusjon: København Universitetssykehus, Rigshospitalet
Akademisk rolle: MD, DMSc. Klinisk professor
Prosjektrolle: Prosjektmedarbeider

7. Prosjektmedarbeider

Navn: Mads Hornum
Stilling: Spesialistreg. i nefrologi
Institusjon: København Universitetssykehus, Rigshospitalet
Akademisk rolle: MD, PhD.
Prosjektrolle: Prosjektmedarbeider

8. Prosjektmedarbeider

Navn: Filip K. Knop
Stilling: Lege og sjef for Diabetologisk forskningsenhet
Institusjon: Gentofte Hospital, Universitetet i København
Akademisk rolle: MD, PhD. Associate Professor
Prosjektrolle: Prosjektmedarbeider

9. Prosjektmedarbeider

Navn: Jens Juul Holst
Stilling: Professor. Sjef for Avdeling for Biomedisinsk forskning
Institusjon: Universitetet i København
Akademisk rolle: MD, PhD. Professor i medisinsk fysiologi
Prosjektrolle: Prosjektmedarbeider

10. Prosjektmedarbeider

Navn:	Kirsten Lund
Stilling:	Biomedisnsk laboratorieforsker
Institusjon:	Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet
Akademisk rolle:	Bioingeniør
Prosjektrolle:	Prosjektmedarbeider

2. Prosjektopplysninger

a. Formål

Prosjektleders prosjektbeskrivelse

Blant nyretransplanterte personer utvikler 10-15 % post-transplantasjon diabetes mellitus (PTDM), og det er i dag et stort fokus på å forebygge og behandle denne tilstanden uten at dette påvirker nyrefunksjon, immundempende behandling eller hjerte/kar-risiko negativt. Det antas at PTDM er en variant av diabetes type 2 som er karakterisert av redusert insulinfrigjøring og insulinfølsomhet, men også av forhøyede nivåer av glukagon. Siden glukagon stimulerer produksjonen av glukose i leveren, fører dette til høye blodsukkerverdier både fastende og etter måltider. Per i dag finnes det ingen informasjon om glukagonfrigjøring i personer med PTDM. Hensikten med denne studien er å undersøke i detalj hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier ved PTDM. Denne kunnskapen vil gjøre det lettere å gi transplanterte personer med PTDM optimal behandling av sin diabetes i fremtiden.

b. Forskningsdata

Registerdata

Nye helseopplysninger

Blodsukkeromsetningen vil undersøkes meget grundig ved hjelp av metoden hyperglykemisk clamp. Fastende blodprøver vil tas for analyse av blodkonsentrasjonen av immundempende legemidler (takrolimus, ciklosporin, mykofenolat) samt standard hematologiske blodprøver. I prøvene som tas under undersøkelsene vil vi måle mengde glukose, insulin, C-peptid (et protein som er forstadiet til insulin), glukagon og GLP-1. Blodtrykk, alder, vekt, høyde, sult/metthetsfølelse underveis i undersøkelsen og medikamentbruk vil også registreres.

Humant biologisk materiale

Materialet skal hentes fra en eksisterende eller oppbevares i en ny biobank

c. Forskningsmetode

Statistiske (kvantitative) analysemetoder

Klinisk undersøkelse

I løpet av studien vil det bli utført 2 undersøkelser av blodsukkeromsetningen til studiedeltakerne med 2-4 ukers mellomrom. På begge undersøkelsesdagene vil vi utføre en hyperglykemisk clamp, hvor glukose tilføres inn i blodet via en venflon. Dette er for å sammenligne blodsukkeromsetningen ved fastende blodsukkernivå (i løpet av 60 minutter) og høyt blodsukkernivå (fastende blodsukker + 5 mmol/L i løpet av 120 minutter). Den ene dagen vil hormonet glukagonlikt peptid 1 (GLP-1) som regulerer blodsukkernivået, tilføres via samme venflon. Den andre dagen vil vanlig saltvann tilføres i stedet for GLP-1 som en kontroll (randomisert rekkefølge). Det vil bli tatt flere blodprøver underveis, men alle vil bli tatt via en venflon i den andre armen for å unngå flere nålestikk. Helt på slutten av undersøkelsen vil vi tilføre 5 gram arginin, som er en naturlig aminosyre, inn i blodet. Arginin stimulerer frigjøringen av både insulin og glukagon, og vil gi oss

et mål på reservekapasiteten kroppen har til å frigjøre insulin og glukagon. Etter at undersøkelsen er avsluttet vil studiedeltakerne få servert et måltid.

Begrunnelse for valg av data og metode

PTDM antas å være en variant av diabetes type 2, men den underliggende patofysiologien for den nedsatte glukosemetabolismen i nyretransplanterte pasienter med PTDM er uklar og ikke undersøkt i detalj. Det gjenstår å undersøke om hyperglukagonemi er en viktig underliggende mekanisme for hyperglykemi i PTDM. Hyperglykemisk clamp utføres fordi GLP-1 effekten på insulin- og glukagoncellene fortrinnsvis ses ved høye blodsukker og ikke ved normale fastende blodsukkernivå.

d. Utvalg

Pasienter/klienter

Nyretransplanterte personer med post-transplantasjon diabetes mellitus (PTDM)

Vi ønsker å undersøke hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier (hyperglykemi) ved PTDM. Ved Nyrefysiologisk Laboratorium, Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet, har vi mulighet til å utføre velkontrollerte studier på nyretransplanterte personer.

Kontrollgruppe

Nyretransplanterte personer uten diabetes

En alder, vekt, BMI og nyrefunksjon-tilsvarende kontrollgruppe inkluderes for å kontrollere for effekter immundempende legemidler har på glukosemetabolismen

e. Antall forskningsdeltakere

Antall forskningsdeltakere i Norge 24

Antall forskningsdeltakere i utlandet 0

Vi antar, i følge litteraturen, at gruppen med nyretransplanterte personer med PTDM vil ha $30 \pm 15\%$ høyere baseline glukagonkonsentrasjoner i plasma enn kontrollgruppen, samt en korresponderende forskjell under GLP-1 induisert suppresjon av glukagon.

Styrkeberegning

Det er behov for 20 pasienter for å sikre en styrke på 90 % for å vise en forskjell ved et signifikansnivå på 5 %. Vi vil inkludere 24 pasienter (12 pasienter i hver gruppe) for å ta hensyn til 20 % frafall i studien

Særskilte prosjektopplysninger

Register data

Pasientjournal

Journaler for nyretransplanterte personer som har vært på kontroll ved Nyrefysiologisk Laboratorium 10 uker og 1 år etter transplantasjon

Data for å finne potensielle studiedeltakere og om disse oppfyller inklusjons/eksklusjonskriterier for studien

Biobank

1. Ny spesifikk forskningsbiobank

Hyperglukagonemi ved PTDM

3. Informasjon, samtykke og personvern

Samtykke innhentes for alle data

Spesifikt informert aktivt skriftlig samtykke

Beskrivelse av rekrutteringsprosedyre

Alle potensielle studiedeltakere vil få tilsendt et brev som redegjør for studien, vedlagt informasjonsskrivet. I brevet vil det understrekes at det ikke vil ha noen konsekvenser for den videre behandlingen og oppfølgingen dersom en velger ikke å delta i studien. Studiedeltakerne skal ha gitt informert samtykke før studiespesifikke undersøkelser igangsettes. Deltakeren får i tillegg muntlig informasjon ved oppmøte, før samtykkeerklæringen underskrives og undersøkelsen igangsettes. Alle deltakerne får en kopi av signert pasientinformasjon. Originalen arkiveres ved Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet. Deltakerne vil for øvrig følge standard oppfølgingsprosedyrer.

4. Forskningsetiske utfordringer ved prosjektet

a. Fordeler

Den enkelte prosjektdeltaker

Blodsukkeromsetningen vil undersøkes meget grundig. Dersom vi opptager noe ved den enkelte prosjektdeltakers helse under studien som krever videre oppfølging, vil vi sørge for at prosjektdeltakeren blir gitt nødvendig informasjon og veiledning rundt dette.

Grupper av personer

Nyretransplanterte personer med post-transplantasjon diabetes mellitus (PTDM)

Behandling av hyperglykemi med orale legemidler i nyretransplanterte personer er en utfordring på grunn av redusert nyrefunksjon og potensielle interaksjoner med immundempende legemidler eller bivirkninger som kan føre til økt hjerte/kar-risiko, som vektøkning eller hyppige hypoglykemiske episoder. Mer detaljert informasjon om hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier ved PTDM vil gjøre det lettere å gi nyretransplanterte personer med PTDM optimal behandling av sin diabetes i fremtiden

Vitenskapen

Funnene i denne studien vil bidra til å øke kunnskapen om den underliggende patofysiologien som fører til hyperglykemi ved PTDM, og denne kunnskapen kan på lengre sikt være fordelaktig i oppfølgingen og behandlingen av transplanterte pasienter

b. Ulemper

Den enkelte prosjektdeltaker

I løpet av studien må prosjektdeltakeren komme til Rikshospitalet to ekstra undersøkelsesdager. Det vil også tas ekstra blodprøver, men ikke i et omfang som vil medføre noen negative effekter på deltakeren.

c. Tiltak

Deltakerdataene vil bli registrert i "Case Report Forms" (CRF) og all informasjon vil bli behandlet

konfidensielt. Enhver komplikasjon vil bli registrert. Studiedeltakerne kan fritt og når som helst uttrykke sitt ønske om å trekke tilbake sitt samtykke til å delta i studien i henhold "Good Clinical Practice" (GCP), uten at dette påvirker den videre oppfølgingen og behandlingen deres.

Eksklusjonskriterier:

- Alvorlig leversykdom
- Pankreatitt (kronisk eller akutt), tidligere tarmreseksjon, inflammatorisk tarmsykdom, kreft (tidligere eller nåværende)
- Estimert glomerulær filtrasjonsrate (GFR) < 25 ml/min/1.73 m²
- Gravide og ammende mødre

d. Forsvarlighet

Hyperglykemisk clamp-undersøkelser er velkjente og har blitt benyttet i flere tidligere studier på transplanterte personer uten problemer. Det vil bli tatt flere blodprøver, men disse tas via en venflon for å unngå flere nålestikk, som er en trygg prosedyre benyttet i generell klinisk praksis. I løpet av undersøkelsene vil det bli samlet mindre enn 2 dl blod, noe som ikke anses å være av klinisk signifikans i disse personene. Vi anser derfor ingen spesiell risiko forbundet med denne studien

5. Sikkerhet, interesser og publisering

a. Personidentifiserbare opplysninger

Opplysninger som registreres i prosjektet er indirekte personidentifiserbare - Aidentifiserte

Koblingsnøkkelen oppbevares hos forskergruppen

b. Internkontroll og sikkerhet

Humant biologisk materiale skal overføres til eller fra utlandet

Biomedicinsk Institutt, Københavns Universitet, Danmark

Personidentifiserbare opplysninger oppbevares:

Bakgrunnsinformasjon (bosted, yrke osv) oppbevares atskilt fra andre opplysninger

Passordbeskyttet

c. Forsikringsdekning for deltakere

Pasientskadeerstatningsloven

d. Vurdering av andre instanser

Egen institusjon

e. Interesser

Finansieringskilder

Prosjektet har mottatt forskningsstipend fra Helse Sør-Øst (prosjektnummer 2013047)

Godtgjøring til institusjon

Ingen

Honorar prosjektleder/-medarbeidere

Ingen

Kompensasjon for forskningsdeltakere

Reisutgifter vil bli dekket. Dersom forskningsdeltakeren trenger overnatting, vil dette gis ved hotellet tilknyttet Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet

Eventuelle interessekonflikter for prosjektleder/-medarbeidere

Ingen

f. Publisering

Det er ikke restriksjoner med hensyn til offentliggjøring og publisering av resultatene fra prosjektet

Resultatene vil publiseres i et vitenskapelig anerkjent tidsskrift (internasjonalt)

h. Tidsramme

Prosjektstart 01.06.2014

Prosjektslutt 01.06.2015

Etter prosjektslutt skal datamaterialet avidentifiseres

Datamaterialet vil oppbevares avidentifisert i 15 år etter studieslutt

6. Vedlegg

#	Type	Filnavn	Lagt inn dato
1.	CV for prosjektleder	CV Prosjektleder.pdf	08.04.14
2.	Forespørsel om deltakelse	Pasientinformasjon ikke PTDM.pdf	08.04.14
3.	Forespørsel om deltakelse	Pasientinformasjon PTDM.pdf	08.04.14
4.	Forskningsprotokoll	Protocol Glucagon study.pdf	08.04.14

7. Ansvarserklæring

Jeg erklærer at prosjektet vil bli gjennomført i henhold til gjeldende lover, forskrifter og retningslinjer

Jeg erklærer at prosjektet vil bli gjennomført i samsvar med opplysninger gitt i denne søknaden

Jeg erklærer at prosjektet vil bli gjennomført i samsvar med eventuelle vilkår for godkjenning gitt av REK eller andre instanser

AIII: 1. vedtak fra REK



Region:
REK sør-øst

Saksbehandler:
Hege Holde Andersson

Telefon:
22845514

Vår dato:
02.06.2014

Vår referanse:
2014/666
REK sør-øst B

Deres dato:
08.04.2014

Deres referanse:

Vår referanse må oppgis ved alle henvendelser

Trond Jenssen
Oslo universitetssykehus HF

2014/666 Glukagon ved diabetes etter nyretransplantasjon

Forskningsansvarlig: Oslo universitetssykehus HF
Prosjektleder: Trond Jenssen

Vi viser til søknad om forhåndsgodkjenning av ovennevnte forskningsprosjekt. Søknaden ble behandlet av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK sør-øst) i møtet 05.05.2014. Vurderingen er gjort med hjemmel i helseforskningsloven § 10, jf. forskningsetikklovens § 4.

Prosjektomtale

Bakgrunnen for prosjektet er at blant nyretransplanterte personer utvikler 10-15 % post-transplantasjon diabetes mellitus (PTDM), og det er i dag et stort fokus på å forebygge og behandle denne tilstanden uten at dette påvirker nyrefunksjon, immundempende behandling eller hjerte/kar-risiko negativt. Det antas at PTDM er en variant av diabetes type 2 som er karakterisert av redusert insulinfrigjøring og insulinfølsomhet, men også av forhøyede nivåer av glukagon. Siden glukagon stimulerer produksjonen av glukose i leveren, fører dette til høye blodsukkerverdier både fastende og etter måltider. Per i dag finnes det ingen informasjon om glukagonfrigjøring i personer med PTDM. Hensikten med denne studien er å undersøke i detalj hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier ved PTDM. Denne kunnskapen vil gjøre det lettere å gi transplanterte personer med PTDM optimal behandling av sin diabetes i fremtiden. Det skal inkluderes 24 pasienter i studien. 12 nyretransplanterte personer med diabetes etter transplantasjon som vil sammenlignes med 12 nyretransplanterte personer uten diabetes. løpet av studien vil det bli utført 2 undersøkelser av blodsukkeromsetningen til studiedeltakerne med 2-4 ukers mellomrom. På begge undersøkelsesdagene vil man utføre en hyperglykemisk clamp på pasientene.

Forskningsbiobank

Det søkes om opprettelse av ny spesifikk forskningsbiobank *Hyperglukagonemi ved PTDM* som vil bestå av blod. Ansvarshavende er Erlend Smeland. Deltakerne gir samtykke til innhenting, oppbevaring og bruk av det biologiske materialet og utlevering til utlandet.

Komiteens vurdering

Den foreliggende informasjonen er ikke tilstrekkelig til at komiteen kan fatte en avgjørelse.

De som inkluderes i studien vil undersøkes ved bruk av metoden hyperglykemisk clamp. Før komiteen tar stilling til prosjektet ber den prosjektleder om en nærmere redegjørelse for denne metoden og forsvarligheten av denne. Hvilke komplikasjoner kan oppstå ved bruk av metoden og hvilke tiltak vil man eventuelt i forbindelse med disse.

Besøksadresse:
Gullhaugveien 1-3, 0484 Oslo

Telefon: 22845511
E-post: post@helseforskning.etikk.no
Web: http://helseforskning.etikk.no/

All post og e-post som inngår i
saksbehandlingen, bes adressert til REK
sør-øst og ikke til enkelte personer

Kindly address all mail and e-mails to
the Regional Ethics Committee, REK
sør-øst, not to individual staff

Komiteens beslutning

Vedtak i saken utsettes. Komiteen tar stilling til prosjektet ved mottatt svar.

Vennligst benytt skjema for tilbakemelding som sendes inn via saksportalen til REK <http://helseforskning.etikkom.no>. Tilbakemeldingen må være oss i hende innen seks måneder.

Med vennlig hilsen

Grete Dyb
førsteamanuensis dr. med.
leder REK sør-øst B

Hege Holde Andersson
Komitésekretær

Kopi til: *Oslo universitetssykehus HF ved øverste administrative ledelse
Forskningsdirektør Erlend B. Smeland, Oslo universitetssykehus HF*

AIV: Tilbakemelding til REK

Tilbakemelding Skjema for tilbakemelding på vedtak i de regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK)

Dokument-id: 506379 Dokument mottatt 02.07.2014

Glukagon ved diabetes etter nyretransplantasjon (2014/666)

1. Generelle opplysninger

a. Prosjektleder

Navn:	Trond Jenssen
Akademisk grad:	Professor
Klinisk kompetanse:	Indremedisin
Stilling:	Overlege
Arbeidssted:	Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet
Arbeidsadresse:	Gaustadjordet
Postnummer:	0027
Sted:	Oslo
Telefon:	23073646
E-post adresse:	trond.jenssen@oslo-universitetssykehus.no

b. Vedtak

Hvilket vedtak gjelder tilbakemeldingen?

Glukagon ved diabetes etter nyretransplantasjon (2014/666)

2. Tilbakemelding

a. Komiteens vedtak

Komiteens beslutning

Vedtak i saken utsettes. Komiteen tar stilling til prosjektet ved mottatt svar.

b. Komiteens spørsmål eller vurdering

Forskningsbiobank

Det søkes om opprettelse av ny spesifikk forskningsbiobank *Hyperglukagonemi ved PTDM* som vil bestå av blod. Ansvarshavende er Erlend Smeland. Deltakerne gir samtykke til innhenting, oppbevaring og bruk av det biologiske materialet og utlevering til utlandet.

Komiteens vurdering

Den foreliggende informasjonen er ikke tilstrekkelig til at komiteen kan fatte en avgjørelse.

De som inkluderes i studien vil undersøkes ved bruk av metoden hyperglykemisk clamp. Før komiteen tar stilling til prosjektet ber den prosjektleder om en nærmere redegjørelse for denne metoden og forsvarligheten av denne. Hvilke komplikasjoner kan oppstå ved bruk av metoden og hvilke tiltak vil man eventuelt i forbindelse med disse.

c. Tilbakemelding til komiteen

Hyperglykemisk clamp-undersøkelser er velkjente og har blitt benyttet i flere tidligere studier på transplanterte personer uten problemer. Det vil bli tatt flere blodprøver, men disse tas via en venflon for å unngå flere nålestikk, som er en trygg prosedyre benyttet i generell klinisk praksis. I løpet av undersøkelsene vil det bli samlet mindre enn 2 dl blod, noe som ikke anses å være av klinisk signifikans i disse personene. Vi anser derfor ingen spesiell risiko forbundet med denne studien.

En hyperglykemisk clamp utføres ved at en vene kanyleres i forsøkspersonens underarm. Hånden er gjerne temperert til 37 °C i et varmeteppe slik at venøst blod er arterialisert (oksygen metningen er høyere enn 80%). Hyperglykemisk clamp vil startes ved tiden $t = 60$ min (se Figur 1 i protokollen for studiedesign), hvor en kroppsvektavhengig intravenøs bolusdose med 50 % glukose vil gis for å øke blodsukkeret til fastende blodsukker + 5 mmol/l, tilsvarende et blodsukker på 10 mmol/l. Blodsukkeret vil holdes (clamped) på dette nivået ved kontinuerlig infusjon av 20 % glukose som justeres i forhold til blodsukkermålinger hvert 5.-15. minutt. Hele prosedyren varer i til sammen 2 timer. Blodsukkernivået på 10 mmol/l under clampen er et fysiologisk blodsukkernivå som mange har etter vanlige måltid, og gir ingen symptomer. Blodsukkeret holdes på dette nivået med høy grad av nøyaktighet (variasjonskoeffisient (CV %) <10 %). Vi måler pasientens egne insulinnivå under prosedyren, intet insulin blir tilført pasienten utenfra. Hensikten er å undersøke pasientens egen insulinrespons under fysiologisk forhøyede blodsukker, samtidig som glukagon (som også frigjøres fra bukspyttkjertelen) supprimeres i blodbanen. Prosedyren

medfører ikke ubehag eller risiko for forsøkspersonen annet enn venøs kanylering for henholdsvis infusjon og blodprøvetaking, prøvetaking (tilsvarende totalt 2 dl blod) og immobilisering mens prosedyren foregår. Vi har stor rutine på denne type studier, og gjennom årene har vi utført mer enn 200 slike prosedyrer i forsøkssammenheng uten noen form for komplikasjoner eller vesentlig ubehag for pasienten. Prosjektleders første anvendelse av prosedyren var allerede på tidlig 1990-tall, 156 hyperglykemiske clamper utført og beskrevet i:

Toft I, Bønaa KH, Ingebretsen OC, Nordøy A, Jenssen T. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on glucose homeostasis and blood pressure in essential hypertension. Ann Intern Med 1995;123:911-8.

Vi håper opplysningene er fyllestgjørende for komitéens merknader, og at prosjektet kan endelig godkjennes.

d. Ny Prosjektleder?

Skal prosjektet ha ny prosjektleder? Nei

e. Endringer i forskningsansvarlig(e)?

Forskningsansvarlig(e) som beholdes

Institusjon	Kontaktperson	Stilling	E-post adresse
Oslo universitetssykehus HF	Erlend B. Smeland	Forskningsdirektør	e.b.smedland@medisin.uio.no

f. Endringer i prosjektmedarbeider(e)

Prosjektmedarbeider(e) som beholdes

Navn:	Stilling:	Institusjon:	Akademisk rolle:	Rolle:
Trond Jenssen	Overlege	Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet	MD, PhD. Professor i medisin	Prosjektleder
Mads Hornum	Spesialistreg. i nefrologi	København Universitetssykehus, Rigshospitalet	MD, PhD.	Prosjektmedarbeider
Erlend Egeland	Student	Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet	Master i farmasi (student)	Prosjektmedarbeider
Filip K. Knop	Lege og sjef for	Gentofte Hospital,	MD, PhD.	Prosjektmedarbeider

	Diabetologisk forskningsenhet	Universitetet i København	Associate Professor	
Kirsten Lund	Biomedisinsk laboratorieforsker	Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet	Bioingeniør	Prosjektmedarbeider
Thea Anine Strøm Halden	Stipendiat	Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet	Cand.Pharm/Master i farmasi	Prosjektmedarbeider
Anders Åsberg	Cand.Scient. Sjef for Nyrefysiologisk laboratorium	Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet	PhD. Professor	Prosjektmedarbeider
Anders Hartmann	Overlege	Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet	MD, PhD. Professor i nefrologi	Prosjektmedarbeider
Jens Juul Holst	Professor. Sjef for Avdeling for Biomedisinsk forskning	Universitetet i København	MD, PhD. Professor i medisinsk fysiologi	Prosjektmedarbeider
Bo Feldt-Rasmussen	Overlege	København Universitetssykehus, Rikshospitalet	MD, DMSc. Klinisk professor	Prosjektmedarbeider

g. Dokumentasjon

3. Vedlegg

Ingen vedlegg

4. Ansvarserklæring

Jeg erklærer at prosjektet vil bli gjennomført

- ☒ I henhold til gjeldende lover, forskrifter og retningslinjer
- ☒ I samsvar med opplysninger gitt i denne søknaden
- ☒ I samsvar med eventuelle vilkår for godkjenning gitt av REK

AV: Vedtak om godkjenning fra REK



Region:
REK sør-øst

Saksbehandler:
Hege Holde Andersson

Telefon:
22845514

Vår dato:
17.09.2014

Vår referanse:
2014/666
REK sør-øst B

Deres dato:
02.07.2014

Deres referanse:

Vår referanse må oppgis ved alle henvendelser

Trond Jenssen
Oslo universitetssykehus HF

2014/666 Glukagon ved diabetes etter nyretransplantasjon

Forskningsansvarlig: Oslo universitetssykehus HF
Prosjektleder: Trond Jenssen

Vi viser til søknad om forhåndsgodkjenning av ovennevnte forskningsprosjekt. Søknaden ble behandlet av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK sør-øst) i møtet 20.08.2014. Vurderingen er gjort med hjemmel i helseforskningsloven (hfl.) § 10, jf. forskningsetikklovens § 4.

Prosjektomtale

Bakgrunnen for prosjektet er at blant nyretransplanterte personer utvikler 10-15 % post-transplantasjon diabetes mellitus (PTDM), og det er i dag et stort fokus på å forebygge og behandle denne tilstanden uten at dette påvirker nyrefunksjon, immundempende behandling eller hjerte/kar-risiko negativt. Det antas at PTDM er en variant av diabetes type 2 som er karakterisert av redusert insulinfrigjøring og insulinfølsomhet, men også av forhøyede nivåer av glukagon. Siden glukagon stimulerer produksjonen av glukose i leveren, fører dette til høye blodsukkerverdier både fastende og etter måltider. Per i dag finnes det ingen informasjon om glukagonfrigjøring i personer med PTDM. Hensikten med denne studien er å undersøke i detalj hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier ved PTDM. Denne kunnskapen vil gjøre det lettere å gi transplanterte personer med PTDM optimal behandling av sin diabetes i fremtiden. Det skal inkluderes 24 pasienter i studien. 12 nyretransplanterte personer med diabetes etter transplantasjon som vil sammenlignes med 12 nyretransplanterte personer uten diabetes. Løpet av studien vil det bli utført 2 undersøkelser av blodsukkeromsetningen til studiedeltakerne med 2-4 ukers mellomrom. På begge undersøkelsesdagene vil man utføre en hyperglykemisk clamp på pasientene.

Forskningsbiobank

Det søkes om opprettelse av ny spesifikk forskningsbiobank Hyperglukagonemi ved PTDM som vil bestå av blod. Ansvarshavende er Erlend Smeland. Deltakerne gir samtykke til innhenting, oppbevaring og bruk av det biologiske materialet og utlevering til utlandet.

Saksgang

Komiteen behandlet første gang søknaden på møtet 05.05.2014. Vedtak i saken ble den gang utsatt da komiteen ønsket en nærmere redegjørelse for metoden hyperglykemisk clamp. Hvilke komplikasjoner kan oppstå ved bruk av metoden og hvilke tiltak man har i forbindelse med eventuelle komplikasjoner.

Prosjektleders tilbakemelding

Komiteen mottok prosjektleders tilbakemelding 02.07.2014. I tilbakemeldingen gir prosjektleder en

Besøksadresse:
Gullhaugveien 1-3, 0484 Oslo

Telefon: 22845511
E-post: post@helseforskning.etikk.no
Web: http://helseforskning.etikk.no/

All post og e-post som inngår i
saksbehandlingen, bes adressert til REK
sør-øst og ikke til enkelte personer

Kindly address all mail and e-mails to
the Regional Ethics Committee, REK
sør-øst, not to individual staff

utfyllende redegjøelse for hvordan en hyperglykemisk clamp utføres. Videre skriver prosjektleder at Hyperglykemisk clamp-undersøkelser er velkjente og har blitt benyttet i flere tidligere studier på transplanterte personer uten problemer. Det vil bli tatt flere blodprøver, men disse tas via en venflon for å unngå flere nålestikk, som er en trygg prosedyre benyttet i generell klinisk praksis. I løpet av undersøkelsene vil det bli samlet mindre enn 2 dl blod, noe som ikke anses å være av klinisk signifikans for disse personene. Man anser derfor ingen spesiell risiko forbundet med denne studien.

Komiteens vurdering

Komiteen mener prosjektleder har gitt en tilfredsstillende tilbakemelding på komiteens spørsmål. Slik prosjektet nå foreligger har komiteen ingen innvendinger til at det gjennomføres.

Informasjonsskriv og samtykkeerklæring

I søknaden opplyses det om at humant biologisk materiale skal overføres til Biomedisinsk Institutt, Københavns Universitet, Danmark. I informasjonsskrivene opplyses det ikke om at humant biologisk materiale skal utføres til utlandet. Komiteen ber derfor om at dette innarbeides i informasjonsskrivet under avsnittet **Biobank**.

Ut fra dette setter komiteen følgende vilkår for godkjenning:

- Informasjonsskrivene revideres i henhold til ovenstående merknader. Reviderte informasjonsskriv sendes komiteen til orientering.

Vedtak

Komiteen godkjenner prosjektet i henhold til helseforskningsloven § 9 og § 33 under forutsetning av at ovennevnte vilkår oppfylles.

I tillegg til ovennevnte vilkår, er godkjenningen gitt under forutsetning av at prosjektet gjennomføres slik det er beskrevet i søknaden.

Tillatelsen gjelder til 01.06.2015. Av dokumentasjonshensyn skal opplysningene likevel bevares inntil 01.06.2020. Opplysningene skal lagres aidentifisert, dvs. atskilt i en nøkkel- og en opplysningsfil. Opplysningene skal deretter slettes eller anonymiseres, senest innen et halvt år fra denne dato.

Komiteen godkjenner også oppførelsen av en spesifikk forskningsbiobank som beskrevet i søknaden.

Biobankregisteret blir underrettet ved kopi av dette brev.

Hvis forskningsbiobanken opphører, nedlegges eller overtas av andre, skal det søkes REK om tillatelse, jf. helseforskningsloven § 30.

Forskningsprosjektets data skal oppbevares forsvarlig, se personopplysningsforskriften kapittel 2, og Helsedirektoratets veileder ” *Personvern og informasjonssikkerhet i forskningsprosjekter innenfor helse- og omsorgssektoren* ”

Klageadgang

Du kan klage på komiteens vedtak, jf. forvaltningslovens § 28 flg. Klagen sendes til REK sør-øst B. Klagefristen er tre uker fra du mottar dette brevet. Dersom vedtaket opprettholdes av REK sør-øst B, sendes klagen videre til Den nasjonale forskningsetiske komité for medisin og helsefag for endelig vurdering.

Sluttmelding og søknad om prosjektendring

Prosjektleder skal sende sluttmelding til REK sør-øst på eget skjema senest 01.12.2015, jf. hfl.

12. Prosjektleder skal sende søknad om prosjektendring til REK sør-øst dersom det skal gjøres vesentlige

endringer i forhold til de opplysninger som er gitt i søknaden, jf. hfl. § 11.

Komiteens avgjørelse var enstemmig.

Med vennlig hilsen

Grete Dyb
førsteamanuensis dr. med.
leder REK sør-øst B

Hege Holde Andersson
Komitésekretær

Kopi til: *Oslo universitetssykehus HF ved øverste administrative ledelse
Forskningsdirektør Erlend B. Smeland, Oslo universitetssykehus HF
Biobankregisteret ved Nina Hovland*

AVI: Informasjonsbrev til PTDM-pasienter

Forespørsel om deltakelse i forskningsprosjektet

"Undersøkelse av hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier ved diabetes etter nyretransplantasjon"

Til deg med diabetes

Bakgrunn og hensikt

Dette er en forespørsel til deg om å delta i et forskningsprosjekt for nyretransplanterte personer som ikke har hatt diabetes før transplantasjon. Blant nyretransplanterte personer utvikler 10-15 % post-transplantasjon diabetes mellitus (PTDM), og det er i dag et stort fokus på å forebygge og behandle denne tilstanden uten at dette påvirker nyrefunksjon, immundempende behandling eller hjerte/kar-risiko negativt. Det antas at PTDM er en variant av diabetes type 2. Blant annet den immundempende behandlingen og virusinfeksjoner øker risikoen for at diabetes oppstår etter transplantasjonen. Diabetes type 2 er ikke bare karakterisert av redusert insulinfrigjøring og insulinfølsomhet, men også forhøyede nivåer av glukagon. Siden glukagon stimulerer produksjonen av sukker (glukose) i leveren, fører dette til høye blodsukkerverdier både fastende og etter måltider. Per i dag finnes det ingen informasjon om glukagonfrigjøring i personer med PTDM. Hensikten med denne studien er å undersøke i detalj hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier ved PTDM. Studien er en nasjonal studie som leger ved Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet har tatt initiativ til, og den vil foregå på Rikshospitalet.

Hva innebærer studien?

I denne studien vil vi undersøke 12 nyretransplanterte personer med diabetes etter transplantasjon som vil sammenlignes med 12 nyretransplanterte personer uten diabetes. I løpet av studien vil det bli utført 2 undersøkelser av blodsukkeromsetningen din med 2-4 ukers mellomrom. Hver av undersøkelsene tar ca. 4 timer å gjennomføre, og disse dagene må du møte fastende (uten mat, drikke eller medikamenter). På begge undersøkelsesdagene vil du få glukose tilført inn i blodet via en venflon. Dette er for å sammenligne blodsukkeromsetningen i kroppen ved fastende blodsukkernivå og høyt blodsukkernivå (ca. 10 mmol/L). Den ene dagen vil du samtidig få et hormon som regulerer blodsukkernivået, såkalt glukagonlikt peptid 1 (GLP-1), tilført via samme venflon. Den andre dagen vil du få vanlig saltvann i stedet for GLP-1 i blodet som en

kontroll. Det vil bli tatt flere blodprøver av deg, men alle vil bli tatt via en venflon i den andre armen for å unngå flere nålestikk. Denne armen vil bli lagt i en varmemansjett for å lette blodprøvetakingen. I prøvene som tas under undersøkelsene vil vi måle mengde glukose, insulin, C-peptid (et protein som er forstadiet til insulin), glukagon og GLP-1. Helt på slutten av undersøkelsen vil du få en liten dose arginin, som er en naturlig aminosyre, tilført inn i blodet. Arginin stimulerer frigjøringen av både insulin og glukagon, og vil gi oss et mål på reservekapasiteten kroppen din har til å frigjøre insulin og glukagon. Etter at undersøkelsen er avsluttet vil du bli servert et måltid.

Mulige fordeler og ulemper

Fordelen med å delta i denne studien er at du vil bidra til at vi får mer detaljert informasjon om hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier ved PTDM. Dette vil gjøre det lettere å gi transplanterte personer med PTDM optimal behandling av sin diabetes i fremtiden. Blodsukkeromsetningen din vil bli undersøkt meget grundig.

Ulempen med å delta er at du må komme til Rikshospitalet to ekstra undersøkelsesdager. Det vil også tas ekstra blodprøver, men ikke i et omfang som vil medføre noen negative effekter på deg. Undersøkelsene vi skal utføre i denne studien er velkjente og har vært brukt mange ganger før på transplanterte personer uten noen problemer, så vi anser ingen spesiell risiko forbundet med denne studien. Ut over dette vil ikke studien medføre endringer i det vanlige behandlings- eller kontrollopplegget etter transplantasjon. Hvis vi oppdager noe ved din helse under denne studien som krever videre oppfølging, vil vi sørge for at du får det.

Undersøkelsene, inklusive oppmøte og tidspunkt for undersøkelsene vil bli gitt skriftlig til deltakerne og i tillegg koordinert ved Nyrefysiologisk laboratorium, slik at deltakerne får hjelp til å være på rett sted til rett tid.

Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg?

Prøvene tatt av deg og informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien og hva den innebærer. Alle opplysningene og prøvene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste. Listen som kan koble ditt navn til koden, vil kun bli oppbevart på Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet, og kun autorisert personell med ansvar for studien har tilgang til denne.

Dataene og prøvene dine vil lagres i 15 år etter at sluttrapport for studien er skrevet. Etter det vil dataene bli anonymisert og prøvene destruert. Tidspunktet for dette vil være avhengig av hvor lang tid det tar før studien er ferdig.

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

Rett til innsyn og sletting av opplysninger om deg og sletting av prøver

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

Biobank

Blodprøvene som blir tatt vil bli lagret i en forskningsbiobank ved Oslo Universitetssykehus (OUS), Rikshospitalet. Enkelte analyser på disse blodprøvene vil bli utført ved Biomedisinsk Institutt, Københavns Universitet, Danmark. Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken, samt at noe av materialet vil bli sendt til Danmark. OUS Rikshospitalet ved forskningsdirektør Erlend Smeland er ansvarshavende for forskningsbiobanken. Det biologiske materialet kan bare brukes etter godkjenning fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK).

Frivillig deltakelse

Det er frivillig å delta i studien. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke til å delta i studien. Dette vil ikke få konsekvenser for din videre behandling. ***Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side.*** Om du nå sier ja til å delta, kan du senere trekke tilbake ditt samtykke uten at det påvirker din øvrige behandling. Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til studien, kan du kontakte;

Professor Trond Jenssen (23 07 19 07) eller PhD.-student Thea Anine Strøm Halden (41 62 35 02).

AVII: Informasjonsbrev til kontrollpasienter

Forespørsel om deltakelse i forskningsprosjektet

”Undersøkelse av hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier ved diabetes etter nyretransplantasjon”

Til deg uten diabetes

Bakgrunn og hensikt

Dette er en forespørsel til deg om å delta i en kontrollgruppe i et forskningsprosjekt for nyretransplanterte personer som ikke har hatt diabetes før transplantasjon. Blant nyretransplanterte personer utvikler 10-15 % post-transplantasjon diabetes mellitus (PTDM), og det er i dag et stort fokus på å forebygge og behandle denne tilstanden uten at dette påvirker nyrefunksjon, immundempende behandling eller hjerte/kar-risiko negativt. Det antas at PTDM er en variant av diabetes type 2. Blant annet den immundempende behandlingen og virusinfeksjoner øker risikoen for at diabetes oppstår etter transplantasjonen. Diabetes type 2 er ikke bare karakterisert av redusert insulinfrigjøring og insulinfølsomhet, men også forhøyede nivåer av glukagon. Siden glukagon stimulerer produksjonen av sukker (glukose) i leveren, fører dette til høye blodsukkerverdier både fastende og etter måltider. Per i dag finnes det ingen informasjon om glukagonfrigjøring i personer med PTDM. Hensikten med denne studien er å undersøke i detalj hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier ved PTDM. Studien er en nasjonal studie som leger ved Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet har tatt initiativ til, og den vil foregå på Rikshospitalet.

Hva innebærer studien?

I denne studien vil vi undersøke 12 nyretransplanterte personer med diabetes etter transplantasjon som vil sammenlignes med 12 nyretransplanterte personer uten diabetes. I løpet av studien vil det bli utført 2 undersøkelser av blodsukkeromsetningen din med 2-4 ukers mellomrom. Hver av undersøkelsene tar ca. 4 timer å gjennomføre, og disse dagene må du møte fastende (uten mat, drikke eller medikamenter). På begge undersøkelsesdagene vil du få glukose tilført inn i blodet via en venflon. Dette er for å sammenligne blodsukkeromsetningen i kroppen ved fastende blodsukkernivå og høyt blodsukkernivå (10 mmol/L). Den ene dagen vil du samtidig få et hormon som regulerer blodsukkernivået, såkalt glukagonlikt peptid 1 (GLP-1), tilført via samme venflon. Den andre dagen vil du få vanlig saltvann i stedet for GLP-1 i blodet som en kontroll. Det vil bli tatt flere blodprøver av deg, men alle vil bli tatt via en venflon i den andre armen for å unngå flere nålestikk. Denne armen vil bli lagt i en varmemansjett for å lette blodprøvetakingen. I prøvene som tas under undersøkelsene vil vi måle mengde glukose, insulin, C-peptid (et protein som er forstadiet til insulin), glukagon og GLP-1. Helt på slutten av undersøkelsen vil du få en liten dose arginin, som er en naturlig aminosyre, tilført inn i blodet. Arginin stimulerer frigjøringen av både

insulin og glukagon, og vil gi oss et mål på reservekapasiteten kroppen din har til å frigjøre insulin og glukagon. Etter at undersøkelsen er avsluttet vil du bli servert et måltid.

Mulige fordeler og ulemper

Fordelen med å delta i denne studien er at du vil bidra til at vi får mer detaljert informasjon om hvilke funksjoner i kroppen som fører til forhøyede blodsukkerverdier PTDM. Dette vil gjøre det lettere å gi transplanterte personer med PTDM optimal behandling av sin diabetes i fremtiden. Blodsukkeromsetningen din vil bli undersøkt meget grundig.

Ulempen med å delta er at du må komme til Rikshospitalet to ekstra undersøkelsesdager. Det vil også tas ekstra blodprøver, men ikke i et omfang som vil medføre noen negative effekter på deg. Undersøkelsene vi skal utføre i denne studien er velkjente og har vært brukt mange ganger før på transplanterte personer uten noen problemer, så vi anser ingen spesiell risiko forbundet med denne studien. Ut over dette vil ikke studien medføre endringer i det vanlige behandlings- eller kontrollopplegget etter transplantasjon. Hvis vi oppdager noe ved din helse under denne studien som krever videre oppfølging, vil vi sørge for at du får det.

Undersøkelsene, inklusive oppmøte og tidspunkt for undersøkelsene vil bli gitt skriftlig til deltakerne og i tillegg koordinert ved Nyrefysiologisk laboratorium, slik at deltakerne får hjelp til å være på rett sted til rett tid.

Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg?

Prøvene tatt av deg og informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien og hva den innebærer. Alle opplysningene og prøvene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste. Listen som kan koble ditt navn til koden, vil kun bli oppbevart på Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet, og kun autorisert personell med ansvar for studien har tilgang til denne.

Dataene og prøvene dine vil lagres i 15 år etter at sluttrapport for studien er skrevet. Etter det vil dataene bli anonymisert og prøvene destruert. Tidspunktet for dette vil være avhengig av hvor lang tid det tar før studien er ferdig.

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

Rett til innsyn og sletting av opplysninger om deg og sletting av prøver

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

Biobank

Blodprøvene som blir tatt vil bli lagret i en forskningsbiobank ved Oslo Universitetssykehus (OUS), Rikshospitalet. Enkelte analyser på disse blodprøvene vil bli utført ved Biomedisinsk Institutt, Københavns Universitet, Danmark. Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken, samt at noe av materialet vil bli sendt til Danmark. OUS Rikshospitalet ved forskningsdirektør Erlend Smeland er ansvarshavende for forskningsbiobanken. Det biologiske materialet kan bare brukes etter godkjenning fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK).

Frivillig deltakelse

Det er frivillig å delta i studien. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke til å delta i studien. Dette vil ikke få konsekvenser for din videre behandling.

Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Om du nå sier ja til å delta, kan du senere trekke tilbake ditt samtykke uten at det påvirker din øvrige behandling. Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til studien, kan du kontakte;

Professor Trond Jenssen (23 07 19 07) eller PhD.-student Thea Anine Strøm Halden (41 62 35 02).

AVIII: Skjema for signering av informert samtykke

Samtykke til deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien

(Signert av prosjektdeltaker, dato)

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

(Signert, rolle i studien, dato)

Appendiks B: Poster Vintermøtet 2015

Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi (NSFT), Beitostølen 29. januar til 1. februar 2015

